

**Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
(Direktor: Professor Dr. med. M.D. Menger)**

**Interaktion von Staphylokokkus aureus mit dem  
mikrovaskulären Endothel  
- Eine in vivo Studie in der Rückenhautkammer des  
Syrischen Goldhamsters -**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes**

**2010**

**vorgelegt von Jonas Roller,  
geboren am 09.06.1982 in Filderstadt**

***Meiner Familie***

**Datum:**

**Dekan:**

**Berichterstatter:**

# INHALT

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Bedeutung von gC1qR/p33 für die Interaktion von S. aureus mit dem mikrovaskulären Endothel .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Implantation chirurgischer Netze bewirkt keine Interaktion von S. aureus mit dem mikrovaskulären Endothel .....</b>	<b>2</b>
<b>2. SUMMARY .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Role of gC1qR/p33 in the adherence of S. aureus to the microvascular endothelium .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Implantation of surgical meshes causes no interaction of S. aureus with the microvascular endothelium .....</b>	<b>4</b>
<b>3. EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>3.1 Bedeutung von gC1qR/p33 für die Interaktion von S. aureus mit dem mikrovaskulären Endothel .....</b>	<b>6</b>
<b>3.2 Einfluss chirurgischer Netzimplantate auf die Interaktion von S. aureus mit dem mikrovaskulären Endothel .....</b>	<b>10</b>
<b>4. ZIEL DER STUDIE .....</b>	<b>15</b>
<b>5. MATERIAL UND METHODIK .....</b>	<b>16</b>
<b>5.1 Versuchstiere .....</b>	<b>16</b>
<b>5.2 Modell .....</b>	<b>16</b>
5.2.1 Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer .....	16
5.2.2 Präparation der Rückenhautkammer .....	17
5.2.3 Implantation des Ultrapro®-Netzes .....	20
<b>5.3 Färbung der Bakterien .....</b>	<b>21</b>
<b>5.4 Katheterimplantation .....</b>	<b>22</b>

<b>5.5 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie</b>	<b>22</b>
5.5.1 Mikrovaskuläre Parameter	24
5.5.1.1 Gefäßdurchmesser	24
5.5.1.2 Blutzellgeschwindigkeit	25
5.5.1.3 Mikrovaskulärer Blutfluss	25
5.5.1.4 Scherrate	26
5.5.1.5 Gefäßwandpermeabilität	27
5.5.1.6 Adhärente Bakterien	27
5.5.1.7 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	28
5.5.1.8 Funktionelle Kapillardichte	28
<b>5.6 Mikroskopische Analyse</b>	<b>28</b>
<b>5.7 Histologie</b>	<b>31</b>
<b>5.8 Serumkonzentration des Antikörpers 74.5.2</b>	<b>31</b>
<b>5.9 Adhärenz-Assay</b>	<b>32</b>
<b>5.10 Versuchsprotokoll</b>	<b>32</b>
5.10.1 Inhibition der Interaktion von <i>S. aureus</i> mit dem mikrovaskulären Endothel durch die Blockade von gC1qR/p33	32
5.10.2 Einfluss chirurgischer Netzimplantate auf die Interaktion von <i>S. aureus</i> mit dem mikrovaskulären Endothel	33
<b>5.11 Statistik</b>	<b>34</b>
<b>6. ERGEBNISSE</b>	<b>35</b>
<b>6.1 Bedeutung von gC1qR/p33 für die Interaktion von <i>S. aureus</i> mit dem mikrovaskulären Endothel</b>	<b>35</b>
6.1.1 Serumkonzentration des Antikörpers 74.5.2	35
6.1.2 Adhärente Bakterien	35
6.1.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	37
6.1.4 Gefäßwandpermeabilität	39
6.1.5 Mikrohämodynamik	40
6.1.6 Adhärenz-Assay	40
<b>6.2 Implantation chirurgischer Netze bewirkt keine Interaktion von <i>S. aureus</i> mit dem mikrovaskulären Endothel</b>	<b>42</b>
6.2.1 Adhärente Bakterien	42
6.2.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	43
6.2.3 Granulationsgewebe	46
6.2.3.1 Adhärente Bakterien in neugebildeten Gefäßen	47
6.2.3.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in neugebildeten Gefäßen	47
6.2.4 Mikrohämodynamik	48

<b>7. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
7.1 Bedeutung von gC1qR/p33 für die Interaktion von <i>S. aureus</i> mit dem mikrovaskulären Endothel	49
7.2 Implantation chirurgischer Netze bewirkt keine Interaktion von <i>S. aureus</i> mit dem mikrovaskulären Endothel	49
<b>8. DISKUSSION</b>	<b>50</b>
8.1 Diskussion des Modells	50
8.1.1 Rückenhautkammer	50
8.1.2 <i>S. aureus</i>	52
8.2 Diskussion der Untersuchungsmethoden	52
8.2.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	52
8.3 Diskussion der Ergebnisse	53
8.3.1 Bedeutung von gC1qR/p33 für die Interaktion von <i>S. aureus</i> mit dem mikrovaskulären Endothel	53
8.3.1.1 Klinische Perspektiven	56
8.3.2 Implantation chirurgischer Netze bewirkt keine Interaktion von <i>S. aureus</i> mit dem mikrovaskulären Endothel	56
8.3.2.1 Klinische Perspektiven	59
<b>9. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>61</b>
<b>10. DANKSAGUNG</b>	<b>72</b>
<b>11. LEBENS LAUF</b>	<b>73</b>
<b>12. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS</b>	<b>75</b>
12.1 Originalarbeiten und Reviews	75
12.2 Zitierfähige Abstracts und Kongressbeiträge	75

# 1. ZUSAMMENFASSUNG

## 1.1 Bedeutung von gC1qR/p33 für die Interaktion von *S. aureus* mit dem mikrovaskulären Endothel

Systemische Infektionen mit *Staphylokokkus aureus* (*S. aureus*) gehen mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Die Ergebnisse früherer Studien zeigen, dass auf Endothelzellen exprimiertes gC1qR/p33 (gC1qR), ein Rezeptor für die Komplementkomponente C1q, mit dem von *S. aureus* exprimierten Protein A interagiert. Des Weiteren ist bekannt, dass bei der infektiösen Endokarditis die Blockade von gC1qR die Kolonisierung des Endokards durch *S. aureus* hemmt. Das Ziel dieses Studienabschnittes war es daher, in vivo zu untersuchen, ob durch die Blockade von gC1qR die Adhärenz von *S. aureus* an das Gefäßendothel inhibiert werden kann.

Zu diesem Zweck wurde bei Syrischen Goldhamstern, die mit dem monoklonalen Antikörper 74.5.2 gegen gC1qR behandelt wurden, eine Rückenhautkammer präpariert. Anschließend wurden den Tieren  $10^9$  Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gefärbte *Staphylokokken* über einen Carotis-Katheter injiziert. Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie erfolgte dann sowohl unter nicht-entzündlichen Bedingungen als auch TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung die in vivo Analyse der Bakterien-Adhärenz und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Mikrozirkulation der Rückenhautkammer. Als Kontrolle dienten Tiere, die lediglich mit dem Vehikel behandelt wurden. Zusätzlich wurden in vitro Adhärenz-Assays durchgeführt, um das Bindungsverhalten von *S. aureus* an humane Endothelzellen nach Blockade von gC1qR zu untersuchen.

Die Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper 74.5.2 führte zu einer signifikanten Reduktion der Adhärenz von *S. aureus* an das venuläre Endothel. Dies war sowohl unter nicht-entzündlichen Bedingungen als auch TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung zu beobachten. Vergleichbare Ergebnisse zeigten die in vitro Versuche mit humanen Endothelzellen. Durch die Blockade von gC1qR kam es zu einer Reduktion der Adhärenz von *S. aureus* an die humanen Endothelzellen. Weiterhin konnte in vivo gezeigt werden, dass die Blockade von gC1qR zu keiner Beeinflussung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in Venolen führte.

Die Ergebnisse des ersten Abschnitts der vorliegenden Arbeit zeigen somit, dass durch die Blockade von gC1qR die Adhärenz von *S. aureus* an das Endothel signifikant reduziert wird. Es ist daher möglich, dass durch diesen Mechanismus bereits in einem frühen Stadium die

Manifestation einer endovaskulären Infektion inhibiert werden kann. Aus diesem Grund stellt die immunologische Inhibition von gC1qR eine vielversprechende therapeutische Strategie in der zukünftigen Behandlung von systemischen *S. aureus*-Infektionen dar.

## **1.2 Implantation chirurgischer Netze bewirkt keine Interaktion von *S. aureus* mit dem mikrovaskulären Endothel**

Die Implantation chirurgischer Netze zur Stabilisierung der Bauchwand ist ein etabliertes Verfahren in der Hernienchirurgie. Im Vergleich zum konventionellen Bauchwandverschluss mittels Naht resultiert die operative Versorgung von Hernien mit chirurgischen Netzen in deutlich reduzierten Rezidivraten. Eine schwerwiegende Komplikation dieses Verfahrens stellt jedoch die bakterielle Infektion der implantierten Netze dar. Aus diesem Grund war es das Ziel des zweiten Abschnittes der vorliegenden Arbeit, sowohl unter nicht-entzündlichen als auch unter entzündlichen Bedingungen zu untersuchen, wie die Interaktion von Bakterien mit dem mikrovaskulären Endothel in direkter Umgebung eines Netzümplantates beeinflusst wird.

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden Ultrapro®-Netze in die Rückenhautkammer von Syrischen Goldhamstern implantiert. Nach 12 Tagen wurden den Tieren  $10^9$  FITC-gefärbte Staphylokokken über einen Carotis-Katheter injiziert. Anschließend wurde mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die Adhärenz von Bakterien sowie die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in Venolen in unmittelbarer Umgebung der Netzümplantate analysiert. Als Kontrolle dienten Venolen in netzfernen Bereichen der Rückenhautkammer, die nicht vom Netzümplantat beeinflusst wurden. Die Experimente erfolgten sowohl unter nicht-entzündlichen Bedingungen als auch TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung. Zusätzlich wurden die Daten mit einer Gruppe von Versuchstieren verglichen, denen zwar ein Netz implantiert, jedoch keine Bakterien appliziert wurden.

Unter nicht-entzündlichen Bedingungen führte die Implantation des chirurgischen Netzes weder zu einer gesteigerten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, noch zu einer Erhöhung der Zahl adhärenter Bakterien in netznahen Venolen. Die topische Applikation von TNF- $\alpha$  auf die Präparation der Rückenhautkammer induzierte eine Entzündungsreaktion mit einer signifikanten Steigerung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und der Bakterien-Adhärenz in netznahen Venolen. Wiederum zeigte sich jedoch kein Einfluss des Netzümplantates auf das Bindungsverhalten von Leukozyten und Bakterien. Eine



vergleichbare Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wiesen Tiere auf, denen keine Bakterien appliziert wurden. Dies zeigt, dass zirkulierende Bakterien nicht die Akkumulation von Leukozyten im Bereich implantierter Ultrapro®-Netze steigern.

Zusammenfassend konnte im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Implantation eines Ultrapro®-Netzes weder unter nicht-entzündlichen noch unter entzündlichen Bedingungen zu einer vermehrten Interaktion von *S. aureus* mit dem mikrovaskulären Endothel führt. Dies lässt darauf schließen, dass das implantierte Biomaterial per se nicht die Bindung von Bakterien am mikrovaskulären Endothel fördert und somit nicht als primäre Ursache einer bakteriellen Netzinfection gesehen werden kann. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse dieses Abschnittes, dass in der Blutbahn zirkulierende Bakterien nicht die Akkumulation von Leukozyten im Bereich implantierter Netze fördern.

## **2. SUMMARY**

### **2.1 Role of gC1qR/p33 in the adherence of *S. aureus* to the micro-vascular endothelium**

Endovascular infections with *S. aureus* are associated with high morbidity and mortality. In vitro studies have shown that gC1qR, a receptor for C1q expressed on endothelial cells, interacts with protein A of *S. aureus*. In addition, in vivo studies revealed that gC1qR blockade reduces *S. aureus* colonization during infective endocarditis. The aim of the present study was to analyze in vivo, whether these results are based on a decreased interaction of *S. aureus* with the microvascular endothelium.

A dorsal skinfold chamber was prepared in Syrian golden hamsters, which were treated with the monoclonal antibody 74.5.2 directed against functional and structural domains of gC1qR or vehicle, respectively. Subsequently, we analyzed the interaction of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled staphylococci and rhodamine-labeled leukocytes with the endothelium of postcapillary venules under physiological conditions as well as TNF- $\alpha$ -induced inflammation by means of intravital fluorescence microscopy.

Administration of 74.5.2 significantly reduced the adherence of *S. aureus* to the endothelium of venules in untreated and TNF- $\alpha$ -exposed tissue. Accordingly, we could also demonstrate in vitro that *S. aureus* adherence to human endothelial cells was significantly reduced by the monoclonal antibody 74.5.2. In contrast, blockade of gC1qR did not affect leukocyte-endothelial cell interaction in vivo.

Our data provide evidence that blockade of gC1qR inhibits the initial step in *S. aureus*-mediated endovascular disease, i.e. adherence of bacteria to the vessel wall. Thus, immunological inhibition of gC1qR by the monoclonal antibody 74.5.2 may represent a promising therapeutic strategy in the future treatment of endovascular infections caused by *S. aureus*.

### **2.2 Implantation of surgical meshes causes no interaction of *S. aureus* with the microvascular endothelium**

In hernia repair, implantation of surgical meshes is a common procedure to increase abdominal wall stability, resulting in significantly reduced recurrence rates when compared to

conventional suture closures. However, mesh implantation is known to be associated with the risk of bacterial infection. Accordingly, the aim of the present study was to analyze in vivo, whether mesh implantation increases the interaction of bacteria with the microvascular endothelium in direct vicinity of the implanted material both under physiological and inflammatory conditions.

Ultrapro<sup>®</sup>-meshes were implanted into the dorsal skinfold chamber of Syrian golden hamsters. After 12 days, 10<sup>9</sup> FITC-labeled staphylococci were injected via a carotid catheter. Subsequently, leukocyte-endothelial cell interaction, microhemodynamics and bacterial binding were analyzed in venules located in direct vicinity to the mesh implants or in distant control tissue under non-inflamed conditions as well as TNF- $\alpha$ -induced inflammation using intravital fluorescence microscopy. The results were compared to those of animals, which did not receive any bacteria.

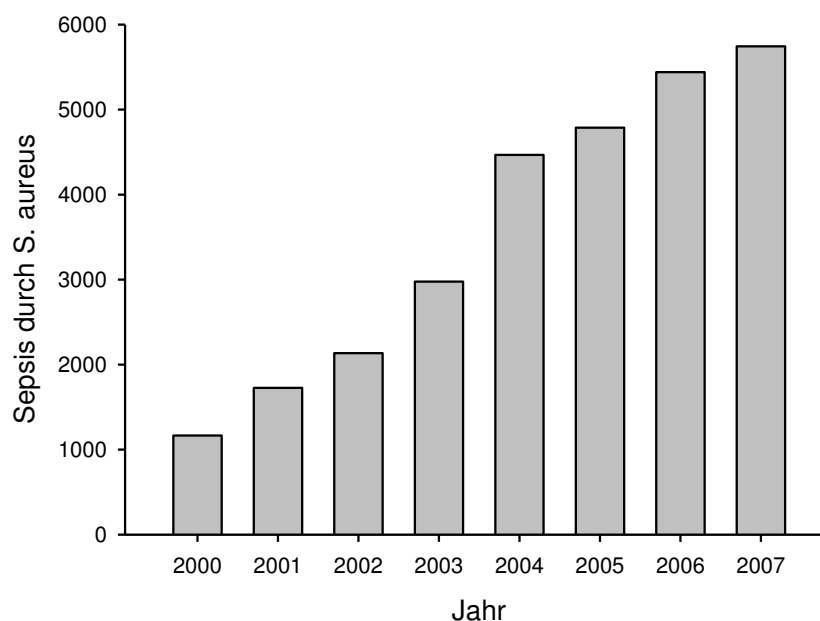
Under baseline conditions, leukocyte-endothelial cell interaction and bacterial adherence was not increased due to the implanted biomaterial, as indicated by a comparable number of adherent leukocytes and bacteria in postcapillary venules of the mesh border zone and distant control tissue. TNF- $\alpha$ -induced inflammation significantly increased the numbers of adherent leukocytes and bacteria in venules located in direct vicinity to the mesh. However, there was again no difference to distant control tissue. Comparable results for the leukocyte-endothelial cell interaction were found in animals, which did not receive bacteria, indicating that circulating bacteria do not affect leukocyte recruitment to the site of mesh implantation.

The present study shows that implanted Ultrapro<sup>®</sup>-meshes do not affect the interaction of *S. aureus* with the microvascular endothelium under physiological conditions or TNF- $\alpha$ -induced inflammation. This indicates that the implanted biomaterial itself is not a trigger for an increased bacterial adherence to the endothelium and therefore cannot be considered as the primary cause for bacterial mesh infection. Besides, this study demonstrates that circulating bacteria do not increase leukocyte recruitment to the site of mesh implantation.

### 3. EINLEITUNG

#### 3.1 Bedeutung von gC1qR/p33 für die Interaktion von *S. aureus* mit dem mikrovaskulären Endothel

*Staphylokokkus aureus* (*S. aureus*) ist einer der wichtigsten Vertreter der für den Menschen fakultativ pathogenen Keime. Der Name „Staphylokokkus“ leitet sich aus den griechischen Wörtern σταφυλή (griechisch „staphyle“ für „Traube“) und κόκκος (griechisch „kokkos“ für „Kügelchen“) her, da man bei mikroskopischer Betrachtung der goldgelben Kolonien die Bakterien traubenartig in Haufen angeordnet vorfindet. *S. aureus* besitzt eine dicke Zellwand, bestehend aus Peptidoglykanen, die zu einer positiven Anfärbung nach Gram führt.



**Abbildung 1:** Vollstationäre Krankenhausaufenthalte durch *S. aureus* verursachte Sepsis in Deutschland von 2000 bis 2007 (Quelle: Statistisches Bundesamt; <http://www.gbe-bund.de/>).

Große Teile der Bevölkerung sind von *S. aureus* kolonisiert. Während bei einem Anteil von ungefähr 20% der betroffenen Individuen eine persistente Besiedlung mit dem Bakterium gefunden wird, liegt die Rate an intermittierend-besiedelten Menschen noch höher [Gordon und Lowy, 2008]. Obwohl die Kolonisierung mit *S. aureus* per se keinen pathologischen Wert besitzt, erhöht sich dadurch das Risiko einer durch das Bakterium verursachten Erkrankung, die in den meisten Fällen durch den kolonisierenden Staphylokokken-Stamm verursacht wird [Kluytmans et al., 1997; von Eiff et al., 2001].

Die Anzahl der durch *S. aureus*-Infektionen verursachten Erkrankungen hat in den letzten Jahren stark zugenommen (*Abbildung 1*). Dies hängt vor allem mit der steigenden Anwendung intravasaler medizinischer Instrumente zusammen [Steinberg et al., 1996]. Gleichzeitig nimmt der Anteil Methicillin-resistenter Stämme zu [Wisplinghoff et al., 2004], wodurch die antibiotische Behandlung dramatisch erschwert wird.

*S. aureus* kann die verschiedensten klinischen Krankheitsbilder verursachen. Unter anderem zählen dazu lokale Befunde an der Haut und am Knochen wie z.B. Dermatitis oder Abszesse [Iwatsuki et al., 2006; Sia und Berbari, 2006]. Gleichzeitig produziert *S. aureus* eine Reihe von Exotoxinen (*Tabelle 1*), die seltene, klinisch eigenständige Krankheitsbilder wie das „Staphylococcal Scalded Skin Syndrom“ oder das „Toxic Shock Syndrom“ verursachen können [Chuang et al., 2005; Nishifuji et al., 2008].

Besondere klinische Bedeutung besitzt das Bakterium jedoch aufgrund seiner Fähigkeit, endovaskuläre Infektionen zu verursachen. Hierbei kommt es zu einer lokalen Kolonisierung des Gefäßendothels. Dies kann eine Bakteriämie bzw. im Extremfall eine generalisierte Sepsis zur Folge haben [Naber, 2008]. Die vom Blutstrom transportierten Keime können in diesem Fall zur Ausbildung metastatischer Infektionsherde [Corey, 2009] oder bei Befall der Herzklappen des Wirtes zur konsekutiven Endokarditis führen [Murray, 2005].

Die Entstehung einer *S. aureus* Infektion durch im Blutkreislauf zirkulierende Bakterien lässt sich in unterschiedliche, pathogenetisch bedeutsame Phasen unterteilen. Nach der Bindung der Bakterien an das Gefäßendothel kommt es zur Etablierung eines primären Infektionsherdes. In diesem haben die Bakterien die Möglichkeit zu persistieren und zu proliferieren. Anschließend erfolgt die Dissemination der Bakterien im Körper des Wirtes mit der Ausbildung von septischen Emboli und dem Befall von Organen.

Eine Grundvoraussetzung für die Entstehung von endovaskulären *S. aureus* Infektionen stellt die Bindung des Bakteriums an das Gefäßendothel des Wirtes dar. Für die Bindung an das Gefäßendothel oder Bestandteile der extrazellulären Matrix exprimiert *S. aureus* eine Reihe von Adhäsionsmolekülen (*Tabelle 1*). Hierbei werden Zellwand-gebundene Formen von Adhäsionsmolekülen, sogenannte MSCRAMMs („Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules“) und sezernierte Formen, sogenannte SERAMs („Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules“) unterschieden [Rivera et al., 2007].

Funktion	Faktoren
Bindung	Fibronektin-Bindungsproteine (FnBP) Clumping Faktoren (CIF) Protein A Extracellular Adherence Protein (Eap) Extracellular Matrix Protein-binding Protein (Emp)
Gewebe-Invasion	Proteasen Lipasen Nukleasen Metalloproteinasen
Modulation von Abwehrmechanismen	Leukocidine Kapsuläre Polysaccharide Protein A Eap
Persistenz	Biofilm-Bildung Small-Colony Varianten (SCV) Intrazelluläre Persistenz
Toxine	Enterotoxine Toxic-Shock-Syndrom Toxine Exfoliatine A-Toxin Peptidoglykane Lipoteichonsäure

**Tabelle 1:** Vereinfachte Übersicht über die unterschiedlichen Pathogenitätsfaktoren von *S. aureus*. Diese Pathogenitätsfaktoren dienen vor allem der Invasion in Gewebe und der Persistenz im Wirt.

Zu diesen Adhäsionsmolekülen zählen die Fibronektin-Bindungsproteine (FnBP A und B) und die Clumping-Faktoren (CIF A und B) [Foster und Hook, 1998; McDevitt et al., 1994; Ni Eidhin et al., 1998; Wann et al., 2000]. Die Funktion dieser Adhäsionsmoleküle besteht in der Bindung des Bakteriums an unterschiedliche Proteinstrukturen des Wirtsorganismus. Zu diesen zählen vor allem Fibronektin und Fibrinogen [Chavakis et al., 2005].

Ein weiteres Protein, das der MSCRAMM-Familie zugeordnet werden kann, ist Protein A. Dieses auf der bakteriellen Zellwand exprimierte Protein besitzt fünf extrazelluläre Domänen, von denen jede ein IgG-Molekül des Wirtes an der Fc-Domäne binden kann [Moks et al., 1986]. Hierdurch kann das Bakterium mit Phagozyten in Konkurrenz um Bindungsstellen an den Fc-Domänen treten. Dies hat einen inhibitorischen Effekt auf die Phagozytose durch das Immunsystem des Wirtes [Gomez et al., 2006]. Daneben wird Protein A zur Bindung des

Bakteriums an Proteinstrukturen des Wirtes benötigt. Einerseits bindet Protein A an den von Willebrand Faktor (vWF), der eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaggregation am geschädigten Endothel spielt [Baruch et al., 1989; Hartleib et al., 2000], andererseits zeigen jüngste Studien, dass Protein A an gC1qR binden kann [Nguyen et al., 2000].

gC1qR dient als Rezeptor für C1q, der ersten Komponente des C1-Komplexes der Komplementkaskade [Calcott und Muller-Eberhard, 1972; Ghebrehiwet et al., 1994]. Gleichzeitig kann das Protein selbst den klassischen Weg der Komplementkaskade aktivieren [Ghebrehiwet et al., 2006]. Die proinflammatorischen Wirkungen von gC1qR beschränken sich jedoch nicht nur auf Wirkungen innerhalb der Komplementkaskade. Das Protein besitzt darüber hinaus grundlegende Funktionen innerhalb des Kallikrein-Kinin Systems (KKS). Das KKS besteht aus den Proteinen Faktor XII, Präkallikrein und hochmolekularem Kininogen. Faktor XII wird durch die Bindung an die Oberfläche von Endothelzellen aktiviert und löst so eine Kaskade aus, die in der Abspaltung von Kininen (z.B. Bradykinin) aus hochmolekularem Kininogen endet [Bryant und Shariat-Madar, 2009]. gC1qR wiederum ist eine der wichtigsten Bindungsstellen für hochmolekulares Kininogen auf Endothelzellen und liefert so die Voraussetzungen für die Initiierung dieser Kaskade [Joseph et al., 1999]. Die freigesetzten Kinine wirken unter anderem als Mediatoren in inflammatorischen Prozessen.

Interessanterweise konnte kürzlich in vivo gezeigt werden, dass die Inhibition von gC1qR die Größe der Vegetationen bei Endokarditiden durch *S. aureus* vermindert [Peerschke et al., 2006]. Da gC1qR auf aktivierten Thrombozyten und innerhalb der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden kann und außerdem lösliches gC1qR die Bindung von *S. aureus* an Fibrinogen erhöht [Peerschke et al., 2006], könnte gC1qR in der Bakterienbindung an geschädigtes Gefäßendothel eine wesentliche Rolle spielen. Weiterhin lässt sich gC1qR jedoch auch auf intakten Endothelzellen nachweisen und wird durch die Wirkung von inflammatorischen Zytokinen sogar vermehrt exprimiert [Guo et al., 1999]. Aus diesem Grund könnte die Inhibition von gC1qR einen vielversprechenden Ansatz darstellen, um die Bindung von *S. aureus* an geschädigtem und intaktem Endothel zu inhibieren.

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es daher, in vivo zu analysieren, ob ein gegen gC1qR gerichteter monoklonaler Antikörper dazu in der Lage ist, die Bindung von *S. aureus* an das venuläre Endothel zu reduzieren.

### **3.2 Einfluss chirurgischer Netzipplantate auf die Interaktion von *S. aureus* mit dem mikrovaskulären Endothel**

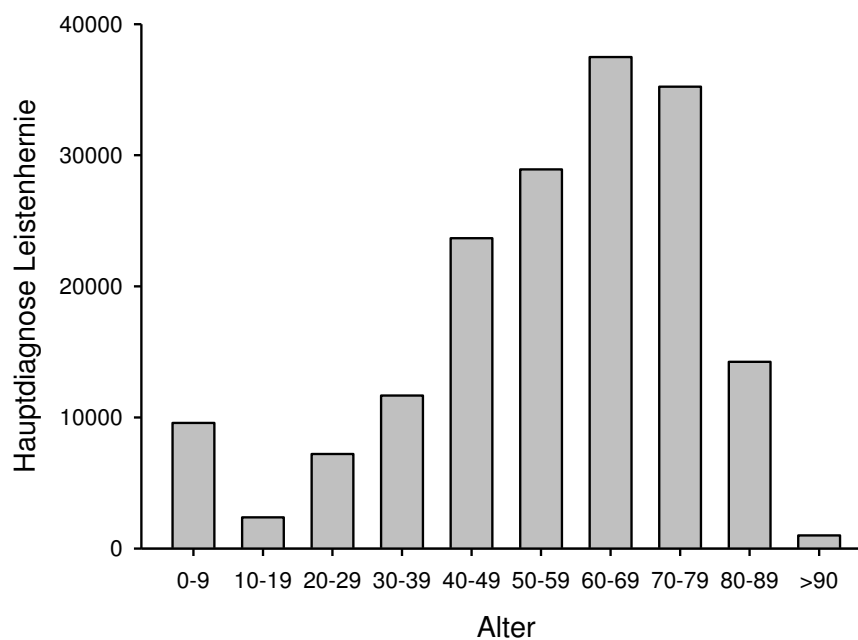
Der Begriff Hernie leitet sich von dem lateinischen Begriff *hernia* („Knospe“) ab. Beschrieben wird damit eine Ausstülpung des Bauchfells durch eine Lücke in den begrenzenden Muskelschichten der Bauchwand. Dadurch bildet sich außerhalb der Bauchhöhle ein Bruchsack aus parietalem Peritoneum, der Anteile des Omentum majus oder des Darms enthalten kann.

Hernien zählen heutzutage zu den häufigsten Ursachen einer Hospitalisierung in den Industriestaaten. Hierbei liegt die Inzidenz bei der männlichen Bevölkerungsgruppe weitaus höher als bei Frauen. Je nach Lokalisation lassen sich innere von äußeren Hernien abgrenzen. Bei den inneren Hernien ist der Bruchsack innerhalb der Bauchhöhle oder des Thorax lokalisiert, während sich der Bruchsack bei äußeren Hernien aus dem Bauchraum gegen die Haut vorwölbt. Austrittslücken (Bruchpforten) von Hernien können entweder angeboren sein oder sekundär entstehen, beispielsweise als Folge einer Laparotomie.

Meist folgt die Lokalisation der Bruchlücken den anatomischen Schwachstellen der Bauchwand, wie dem Leistenkanal oder den Austrittsstellen der Beingefäße. Begünstigende Faktoren in der Entstehung von Hernien sind dabei nicht nur Schwachstellen des Bindegewebes und Übergewicht [Sugerman et al., 1996], sondern auch erhöhter intraabdomineller Druck, beispielsweise durch chronische Obstipation oder chronischen Husten [Burmeister et al., 2004; Hendry et al., 2008].

Die häufigste Hernienform ist die Leistenhernie. So lag in Deutschland im Jahr 2007 bei männlichen Patienten die Fallzahl von stationär behandelten Leistenhernien mit 148.363 nur knapp hinter der Anzahl stationär behandelter Herzinsuffizienzen (156.893) (Quelle: Statistisches Bundesamt; <http://www.gbe-bund.de/>). Im gleichen Zeitraum wurden nur 20.949 weibliche Patienten wegen einer Leistenhernie stationär behandelt. Die Prävalenz der Leistenhernie steigt mit zunehmendem Lebensalter (*Abbildung 2*). Ausgenommen davon ist ein Häufigkeitsgipfel bei Säuglingen unter einem Jahr, der die angeborenen Formen der Hernien repräsentiert.





**Abbildung 2:** Vollstationäre Krankenhausaufenthalte mit Hauptdiagnose Leistenhernie in Deutschland im Jahr 2008 (Quelle: Statistisches Bundesamt, <http://www.gbe-bund.de/>).

Leistenhernien können mit Hilfe der Nyhus-Klassifikation eingeteilt werden. Diese Klassifikation ist nicht nur für die klinische Einteilung der Hernien relevant, sondern dient auch als Entscheidungshilfe dafür, ob die Herniorraphie mit einem chirurgischen Netzimplantat therapiert werden sollte. Während Hernien mit stabiler Hinterwand des Leistenkanals (*Tabelle 2*; Typ 1 oder 2) nicht zwingend mit einem chirurgischen Netz versorgt werden müssen, empfiehlt sich bei instabiler Hinterwand (Typ 3 und 4) zur operativen Herniorraphie die Verwendung eines chirurgischen Netzes [Nyhus, 1993].

Ohne Hinterwanddefekt	Typ 1	Indirekte Leistenhernie	Innerer Leistenring nicht erweitert
	Typ 2	Indirekte Leistenhernie	Innerer Leistenring erweitert
Mit Hinterwanddefekt	Typ 3A	Direkte Leistenhernie	Reiner Hinterwanddefekt
	Typ 3B	Indirekte Leistenhernie	Hinterwanddefekt kombiniert mit erweitertem inneren Leistenring
	Typ 3C	Femoralhernie	
	Typ 4	Rezidivhernie	

**Tabelle 2:** Nyhus Klassifikation zur Einteilung von Leistenhernien

Die Symptomatik von Hernien ist oft durch intraabdominelle Missempfindungen und ziehende Schmerzen gekennzeichnet. Kleinere, nach außen vorfallende Hernien lassen sich meist bei Erhöhung des intraabdominellen Druckes, z.B. bei Husten oder Pressen, in den Bruchlücken palpieren. Bei größeren Hernien kann es hier sogar zum sichtbaren Hervortreten des Bruchsacks kommen. Darüber hinaus kann sich eine lebensbedrohliche Symptomatik entwickeln, falls sich Anteile des Darmes oder des Bauchfells innerhalb des Bruchsacks befinden und es zur Inkarzeration in der Bruchlücke mit nachfolgender Ischämie der betreffenden Anteile kommt.

Kommt es zu einer Inkarzeration und ist die Hernie irreponibel, muss die operative Versorgung und Abtragung des Bruchsacks zur Wiederherstellung der Blutversorgung sofort erfolgen. Meist wird jedoch die operative Therapie bereits elektiv bei geringem Beschwerdebild durchgeführt. Dabei hat sich die operative Technik zur Stabilisierung der Bauchwand in den letzten Jahrzehnten stark gewandelt. Während früher meist die Herniorraphie mittels Nahttechnik favorisiert wurde, gilt heute bei fast allen Hernien die Implantation eines chirurgischen Netzes als Goldstandard [Kurzer et al., 2003; Neumayer et al., 2004]. Exemplarisch wird dies durch die Daten von Patienten verdeutlicht, die sich zwischen 1998 und 2005 in Dänemark einer operativen Herniorraphie unterzogen. Während anfangs weniger als 40% der Patienten bei Hernienoperationen ein chirurgisches Netz zur Stabilisierung der Bauchwand implantiert wurde, waren es am Ende der Studienzeit 80% [Kehlet und Bay-Nielsen, 2008]. Der Vorteil bei der Verwendung von chirurgischen Netzen im Gegensatz zu konventionellen Nahttechniken liegt vor allem im spannungsfreien Verschluss der Bruchlücke [Milic und Pejic, 2003]. Dies führt zu einer Reduktion der postoperativen Schmerzen, verbunden mit einer schnelleren Rekonvaleszenz des Patienten [Collaboration, 2000]. Des Weiteren konnten mit der Einführung chirurgischer Netze zur Hernientherapie seit Mitte der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts die Rezidivraten signifikant gesenkt werden [Burger et al., 2004; Rutkow, 2003].

Ein ideales chirurgisches Netz sollte biokompatibel, sterilisierbar, mechanisch belastbar, billig produzierbar und resistent gegen Infektionen sein [Cobb et al., 2009]. In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl verschiedener chirurgischer Netze entwickelt, die sich in Form und Materialzusammensetzung teilweise stark voneinander unterscheiden. Generell wird bei kommerziell verfügbaren Netzmaterialien zwischen synthetischen Polymeren und Materialien auf biologischer Basis unterschieden. Beispiele für synthetische Polymere sind Polypropylen (PP), Polyester (PES) und expandiertes Polytetrafluorethylen (ePTFE). Zusätzlich werden teilweise resorbierbare Polymere, wie z.B. das Polyglactin, in

chirurgische Netze eingebaut. Dadurch erhält man die heute regelmäßig im klinischen Alltag verwendeten teilresorbierbaren Netzmaterialien. Die resorbierbaren Anteile des Netzes werden durch Hydrolyse je nach Material innerhalb von 90-120 Tagen vom Körper abgebaut, wodurch der Anteil an Fremdmaterial, das im Körper des Patienten verbleibt, minimiert werden kann. Gleichzeitig bleibt die Belastungsfähigkeit des Netzmaterials so erhalten, dass das Material auch intraabdominellen Druckspitzen standhält [Bellon et al., 2008].

Neben den Material-spezifischen Eigenschaften chirurgischer Netze kann die Einteilung der Netzmaterialien auch anhand von Strukturmerkmalen erfolgen. Grundsätzlich werden dabei leichtgewichtige von schwergewichtigen chirurgischen Netzen unterschieden, wobei sich diese Einteilung auf das Gewicht pro Fläche ( $\text{g/m}^2$ ) bezieht. Hierbei zeigen sich die großporigen, leichtgewichtigen Netzmaterialien als vorteilhaft, da sie nach Implantation geringere postoperative Schmerzen verursachen [O'Dwyer et al., 2005]. Darüber hinaus erlauben die großen Poren eine höhere Elastizität des Netzmaterials, wodurch sich das Netzmaterial bei der Implantation besser handhaben lässt und sich den anatomischen Begebenheiten des Empfängergewebes besser anpasst.

Trotz der Vorteile einer Herniorraphie mit Hilfe eines chirurgischen Netzes birgt diese auch zahlreiche Risiken. Dazu zählen neben postoperativen Schmerzen mit der Gefahr der Chronifizierung auch die Ausbildung von Wundseromen und Fistelgängen in benachbarte Organe [Cobb et al., 2003; Nienhuijs et al., 2007]. Eine der gefürchtetsten Komplikationen stellt die bakterielle Infektion des Netzmaterials dar. Diese tritt in ungefähr 1% der Netzimplantationen auf [Jezupovs und Mihelsons, 2006]. Unterschieden werden die frühe Netzinfection, die sich bereits wenige Tage postoperativ ausbilden kann, und die späte Netzinfection, die typischerweise erst nach Monaten bis Jahren auftritt [Mann et al., 1998]. Während die Inzidenz der frühen Netzinfection durch den breiten Einsatz einer perioperativen Antibiotikaphylaxe gesenkt werden kann [Aufenacker et al., 2004; Rios et al., 2001; Yerdel et al., 2001], ist die spät auftretende Netzinfection in der Regel nicht durch die Gabe von Antibiotika zu behandeln. Als einzige therapeutische Möglichkeit bleibt hier in den meisten Fällen ein erneuter chirurgischer Eingriff mit kompletter Entfernung des implantierten Biomaterials [Jezupovs und Mihelsons, 2006].

Derzeit werden unterschiedliche Entstehungsmechanismen der späten Netzinfection diskutiert. Denkbar ist beispielsweise eine Verschleppung von Keimen während des operativen Eingriffs mit konsekutiver Persistenz der Erreger innerhalb eines Biofilmes auf dem Netzmaterial [Bellon et al., 2004]. Alternativ könnten die Infektionen als Komplikation

von persistierenden Flüssigkeitsansammlungen entstehen [Mann et al., 1998]. Weiterhin könnte eine späte Netzinfection auch durch eine hämatogene Invasion des Granulationsgewebes um das Biomaterial durch Bakterien entstehen. So ist das Granulationsgewebe im Vergleich zu physiologischem Gewebe besonders exponiert gegenüber einer bakteriellen Invasion, da es sich auf Basis einer transienten inflammatorischen Reaktion ausgebildet hat [Bellon et al., 1994; Delikoukos et al., 2007; Foschi et al., 1998]. Bislang wurde jedoch noch nicht untersucht, ob das implantierte Biomaterial selbst eine Bakterien-Endothelzell-Interaktion innerhalb der Gefäße des Granulationsgewebes um das Netzimplantat beeinflusst, und somit die Entwicklung einer späten Netzinfection begünstigt.

Aus diesem Grund war es das Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit, in vivo zu analysieren, ob ein implantiertes chirurgisches Netz zu einer erhöhten Adhärenz von im Blutkreislauf zirkulierenden Bakterien an das Endothel der Gefäße um das Netzimplantat führt. Für die Versuche wurde *S. aureus* verwendet, da dies der am häufigsten isolierte Erreger im Rahmen von Netzinfectionen ist [Mann et al., 1998]. Entsprechend des ersten Teils dieser Arbeit wurden die Versuche mit Hilfe der Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster durchgeführt. Als Netzimplantat wurde das klinisch häufig eingesetzte Ultrapro®-Netz verwendet. Dabei handelt es sich um ein leichtgewichtiges, monofilamentäres, großporiges Komposite-Netz, bestehend aus nichtresorbierbaren PP und resorbierbaren Polyglecapron (Monocryl®)-Anteilen.

## 4. ZIEL DER STUDIE

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, in vivo die Interaktion von *S. aureus* mit dem mikrovaskulären Endothel im Modell der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters zu analysieren.

Hierbei sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

- I. Beeinflusst die Inhibition von gC1qR mittels monoklonalem Antikörper die Bakterien-Endothelzell-Interaktion unter nicht-entzündlichen sowie unter entzündlichen Bedingungen?
- II. Welchen Einfluss hat ein implantiertes Prolene-Monocryl-Komposite-Netz (Ultrapro®) auf die Bakterien-Endothelzell-Interaktion in den Blutgefäßen der Implantationsstelle unter nicht-entzündlichen sowie unter entzündlichen Bedingungen?

## **5. MATERIAL UND METHODIK**

### **5.1 Versuchstiere**

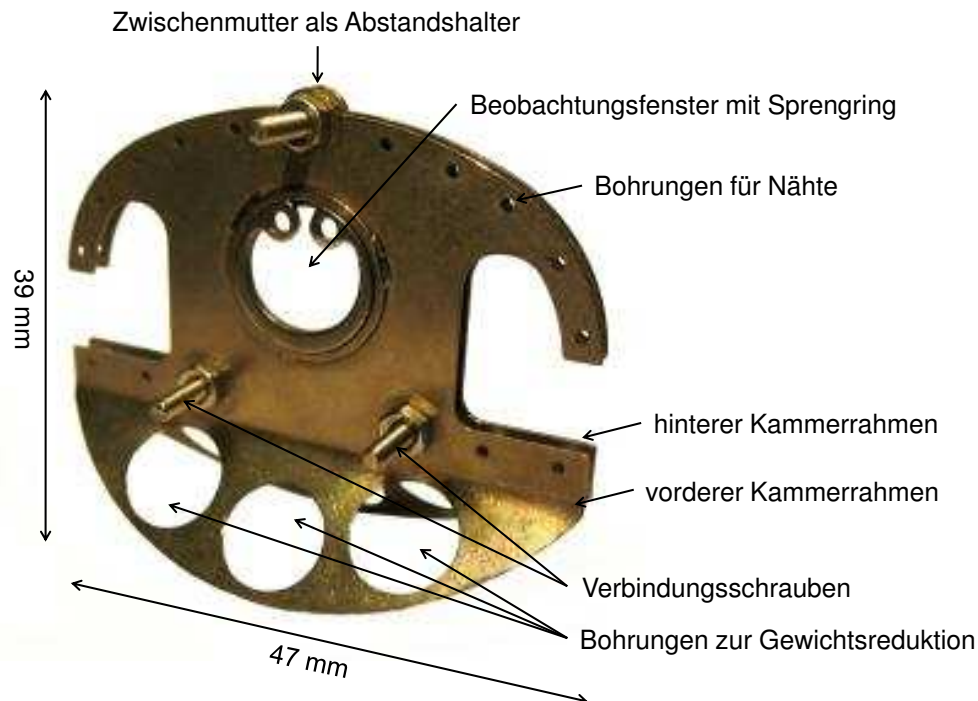
Für sämtliche Experimente wurden männliche Syrische Goldhamster im Alter von 8-10 Wochen mit einem Körpergewicht von 60-80g verwendet. Die Tiere entstammten der hauseigenen Inzucht des Institutes für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes. Während der Versuche wurden die Tiere einzeln in Käfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Standard-Laborfutter (Altromin; Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum. Alle Tiere waren einem regelmäßigen Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden ausgesetzt. Die Versuche wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz vom Landratsamt Homburg/Saar genehmigt.

### **5.2 Modell**

#### **5.2.1 Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer**

Für die Versuche wurde das Modell der Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster verwendet. Die Rückenhautkammer besteht aus zwei symmetrischen Titan-Rahmen mit einem Gesamtgewicht von ca. 4,5g (*Abbildung 3*). Die Titan-Rahmen werden mittels Verbindungsschrauben über der aufgespannten Rückenhaut fixiert. In den vorderen Kammerteil ist ein Sichtfenster eingelassen, das mittels Deckglas verschlossen werden kann. In diesem Bereich ist es möglich, mit Hilfe intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die gesamte Mikrozirkulation der freigelegten quergestreiften Hautmuskulatur mikroskopisch zu visualisieren. Im Einzelnen umfasst dies die terminalen Arteriolen, die nutritiven Kapillaren, die postkapillären Venolen sowie die Sammelvenolen. Hierbei sind nicht nur Untersuchungen zu einem einzigen Zeitpunkt, sondern auch repetitiv über einen Zeitraum von bis zu 3 Wochen möglich. Die Rückenhautkammer hat sich seit ihrer Erstbeschreibung 1980 [Endrich et al., 1980] als ein sehr vielseitiges Modell erwiesen. Mit Hilfe der Rückenhautkammer lässt sich nicht nur die Vaskularisierung von transplantierten Organgeweben [Funk et al., 1986] und Tumoren beurteilen [Vajkoczy et al., 1998]. Sie eignet sich auch hervorragend zur Prüfung der Biokompatibilität und Vaskularisierung synthetischer Materialien, wie z.B. unterschiedliche Metalle oder Kunststoffe, aus denen bestimmte Implantate hergestellt werden [Kraft et al., 2001; Laschke et al., 2005a; Menger et al., 1990]. Hierbei lassen sich Entzündungsreaktionen, die von den Materialien hervorgerufen werden, durch Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion innerhalb der Gefäße quantifizieren.

Darüber hinaus kann innerhalb der Mikrozirkulation auch die Endothelzell-Interaktion von Thrombozyten [Buerkle et al., 2004] oder Bakterien [Laschke et al., 2005b] analysiert werden.

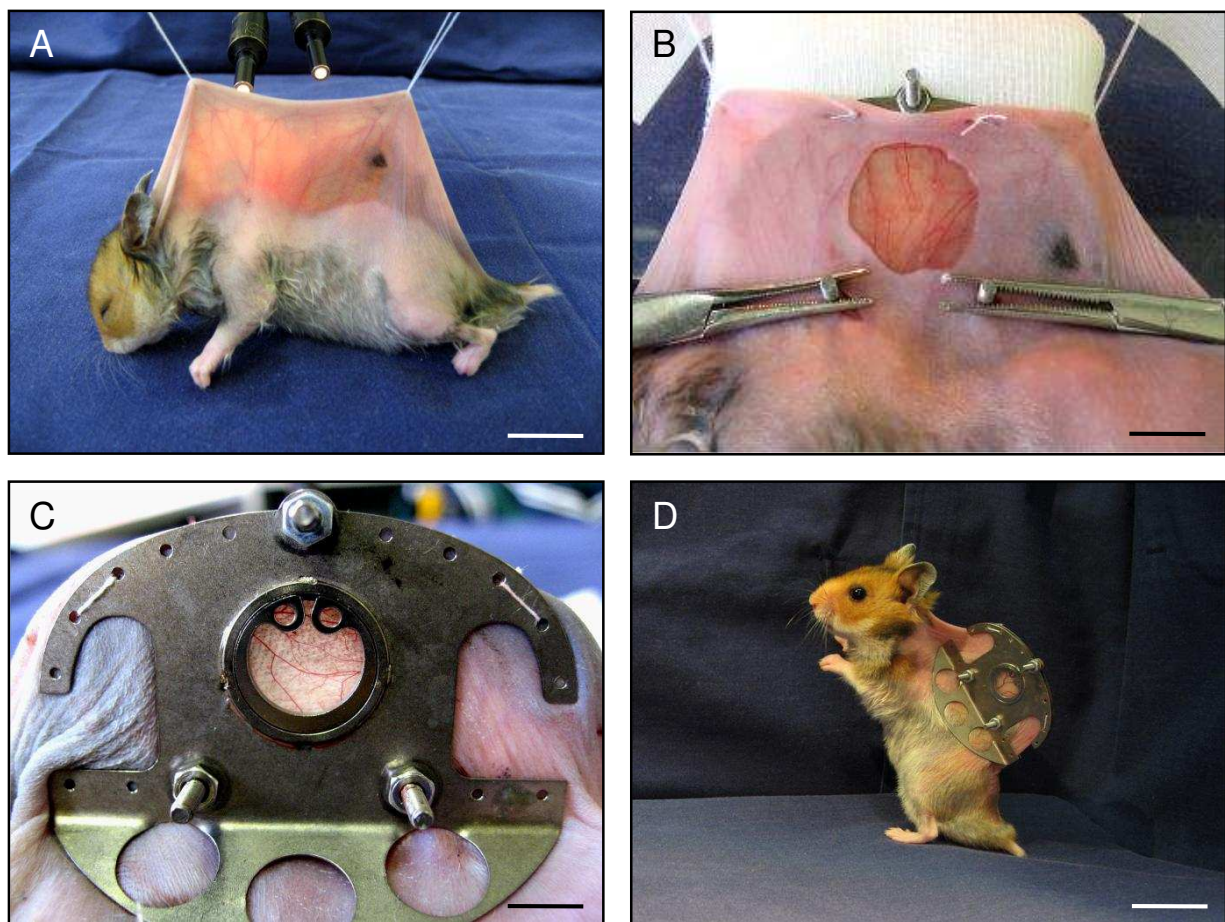


**Abbildung 3:** Rückenhautkammer, bestehend aus vorderem und hinterem Kammerrahmen. Beide Rahmentteile werden durch die Verbindungsschrauben gegeneinander fixiert. Eine Mutter zwischen beiden Rahmentteilen dient dabei als Abstandshalter. In die Kammer sind zusätzliche Bohrungen zur Nahtfixierung der Kammer eingebracht. Die großen Bohrungen am kaudalen Rand des Kammerrahmens dienen der Gewichtsreduktion. Der Durchmesser des Sichtfensters beträgt 11mm. Darin eingelassen befindet sich ein Deckglas, um die freigelegte quergestreifte Hautmuskulatur direkt einsehen zu können. Das Deckglas wird mit Hilfe eines Sprengrings fixiert.

### 5.2.2 Präparation der Rückenhautkammer

Die Präparation der Rückenhautkammer erfolgte in Allgemeinanästhesie. Diese wurde mittels intraperitonealer Injektion von 50mg/kg Körpergewicht (KG) Pentobarbital (Narcoren; Merial GmbH, Halbermoos, Deutschland) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Enthaarung der Rückenhaut mittels Elektrorasur (Elektra II GH204; Aeskulap, Tuttlingen, Deutschland) und chemischer Depilation (Plica med Creme; Asid Bonz, Böblingen, Deutschland). Dann wurden die entsprechenden Hautpartien mit warmem Wasser gesäubert und mit Alkohol desinfiziert. Um die Kammer passgenau fixieren zu können, wurde bei den Tieren in Bauchlage die elastische Falte der Rückenhaut angehoben und mit Hilfe von zwei Haltefäden vertikal aufgespannt (Abbildung 4 A). Unter Gegenlichtkontrolle war es

anschließend möglich, die entlang der Schulter verlaufenden Hauptgefäße für die Blutversorgung der Rückenhaut zu visualisieren. Bei der Positionierung und Fixation des rückwärtigen Kammerrahmens mittels Naht (Seide 5.0) wurde größtes Augenmerk darauf gelegt, diese Blutgefäße nicht zu komprimieren oder zu verletzen, um weiterhin eine physiologische Perfusion der Rückenhautpräparation zu gewährleisten. Dann erfolgte an der aufgestellten Hautfalte die Inzision für die zwei basalen Befestigungsschrauben.

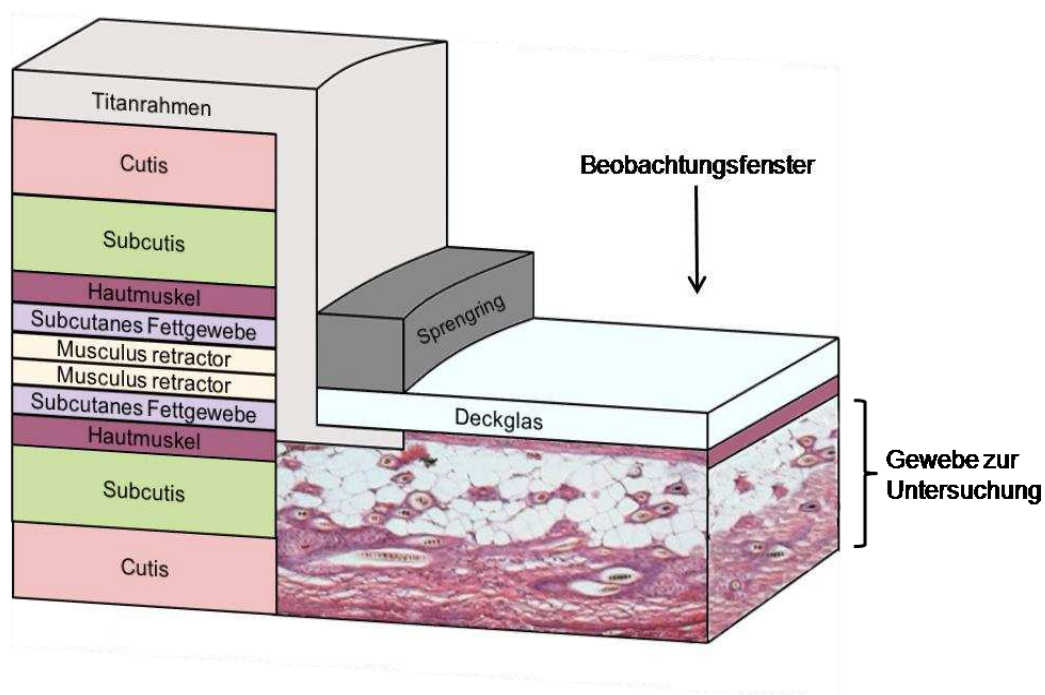


**Abbildung 4:** Zur Präparation der Rückenhautkammer wurde die Rückenhaut mittels Haltefäden aufgespannt und die Hauptgefäße mittels Diaphanoskopie dargestellt (A). Anschließend erfolgte die Entfernung der Oberhautschichten innerhalb eines zirkulären Ausschnittes (B). Rückenhautkammer mit Deckglas und Sprengring nach erfolgreicher Präparation (C). Waches Versuchstier nach Präparation der Rückenhautkammer (D). Maßstäbe: A=3cm; B=1cm; C=7mm; D=3cm.

Für die nachfolgende Präparation des Beobachtungsbereichs innerhalb der Rückenhautkammer wurden die Haltefäden entfernt und das Versuchstier in Seitenlage gebracht. Die Befestigungsschrauben der Rückseite waren dabei vorübergehend mit zwei Klemmen fixiert (Abbildung 4 B). Es erfolgte nun mit Hilfe eines Stereo-



Operationsmikroskops (Wild; 38400; Heerbrugg, Schweiz) in einem zirkulären Ausschnitt mit einem Durchmesser von ca.15mm die Entfernung der Cutis, Subcutis, der quergestreiften Hautmuskulatur (M. panniculus carnosus), des subkutanen Fettgewebes und der Mm. Retractori (*Abbildung 4 B*). Dieser Ausschnitt war größer als der eigentliche Durchmesser des Beobachtungsfensters (11mm), wodurch das Sistieren der Gewebepерfusion, verursacht durch eine übermäßige Kompression der Hautschichten unter dem Rahmen, vermieden werden konnte. Die verbleibenden Gewebeschichten (Cutis, Subcutis und quergestreifte Hautmuskulatur der Gegenseite; *Abbildung 5*) wurden mit steriler Kochsalzlösung gespült und im Anschluss daran der Kammerrahmen der Vorderseite aufgesetzt. In diesen war das Beobachtungsfenster integriert (*Abbildung 4 C*). Dieses beinhaltete ein rundes Deckglas, an das sich der quergestreifte Hautmuskel per Adhäsion direkt anlegte. Dadurch konnte die Kammerpräparation vor Verunreinigungen und vor Austrocknung geschützt werden. Die Fixierung des Deckglases erfolgte mittels eines entfernbaren Sprenglings, wodurch im Versuchsverlauf jederzeit die Möglichkeit des Zugangs zur Präparation gewährleistet blieb.

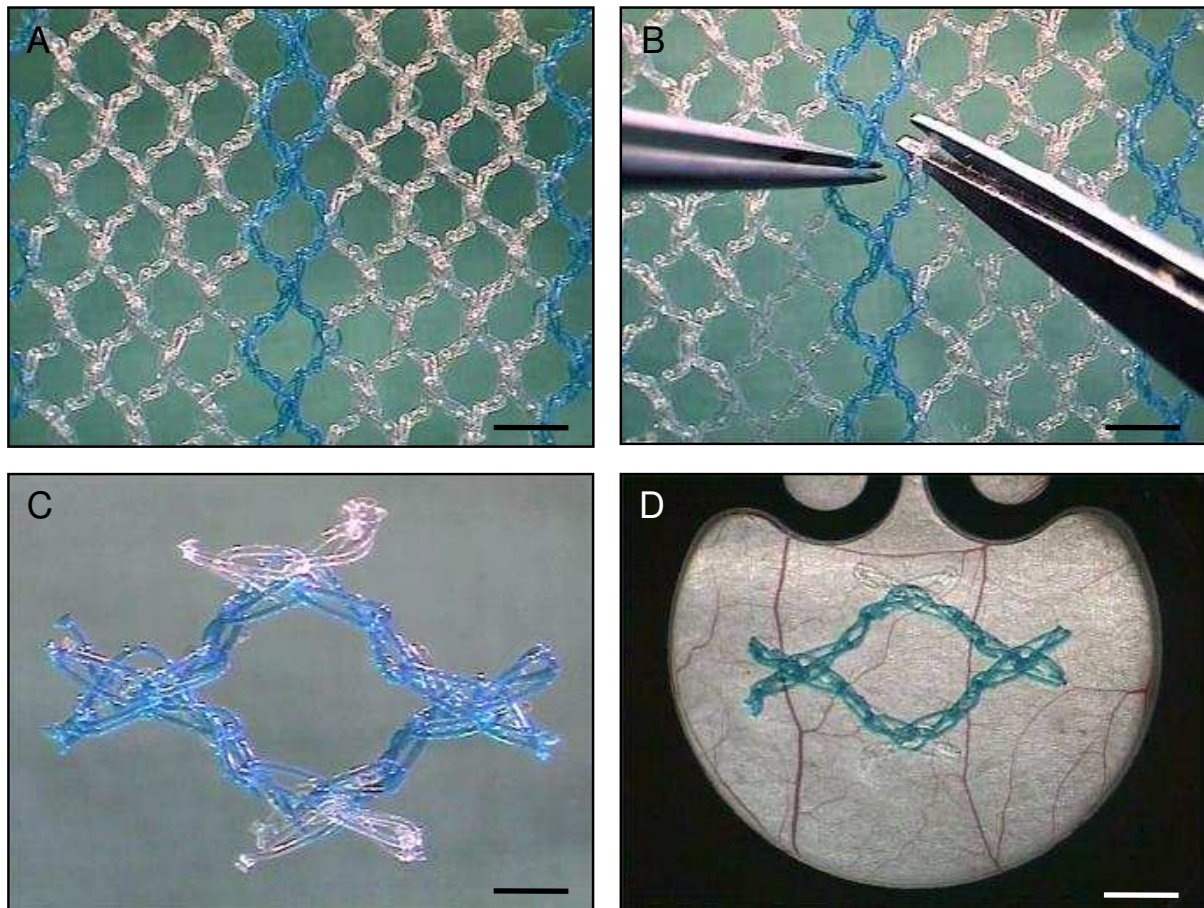


**Abbildung 5:** Schematischer Aufbau einer Rückenhautkammerpräparation.

Im Anschluss an die Präparation der Rückenhautkammer konnten sich die Tiere für 48h von der Belastung durch die Narkose und das chirurgische Trauma erholen. Die Versuchstiere tolerierten die Rückenhautkammer gut (*Abbildung 4 D*), was sich in einem unveränderten Schlaf-, Putz- und Fressverhalten widerspiegelte.

### 5.2.3 Implantation des Ultrapro®-Netzes

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ultrapro®-Netz (Ethicon; Norderstedt, Deutschland) handelte es sich um ein monofilamentäres, teilresorbierbares Netz. Dieses wird zu ungefähr gleichen Teilen aus nicht resorbierbarem Polypropylen (Prolene®) und resorbierbarem Poliglecaprone (Monocryl®) gefertigt.



**Abbildung 6:** Präparation des Netzümplantates für die Versuche in der Rückenhautkammer. Unter sterilen Bedingungen wurde eine ca. 3x3mm große Masche des Ultrapro®-Netzes herausgetrennt (A-C). Diese Netzmasche wurde anschließend in die Rückenhautkammer implantiert (D). Maßstäbe: A, B=3,1mm; C=1,1mm; D=1,7mm.

Um die Größe des zu transplantierenden Netzes an die Größe des Sichtfensters der Rückenhautkammer anzupassen, wurde unter einem Stereo-Operationsmikroskop jeweils eine Masche des vorhandenen Netzes unter sterilen Bedingungen herausgetrennt (Abbildung 6 A-D).

Die Implantation des chirurgischen Netzes erfolgte 48 Stunden nach Präparation der Rückenhautkammer. Das Tier wurde hierzu in Narkose in Seitenlage gebracht und der

Sprengling des Sichtfensters entfernt. Nach Entfernung des Deckglases der Rückenhautkammer wurde unter operationsmikroskopischer Sicht die Kammer mit sterilem 0,9% NaCl gespült und die ca. 3x3mm große Masche des Ultrapro®-Netzes zentral in die Kammer eingelegt. Anschließend erfolgte der Verschluss der Kammer durch ein neues Deckglas, das erneut mit einem Sprengling fixiert wurde.

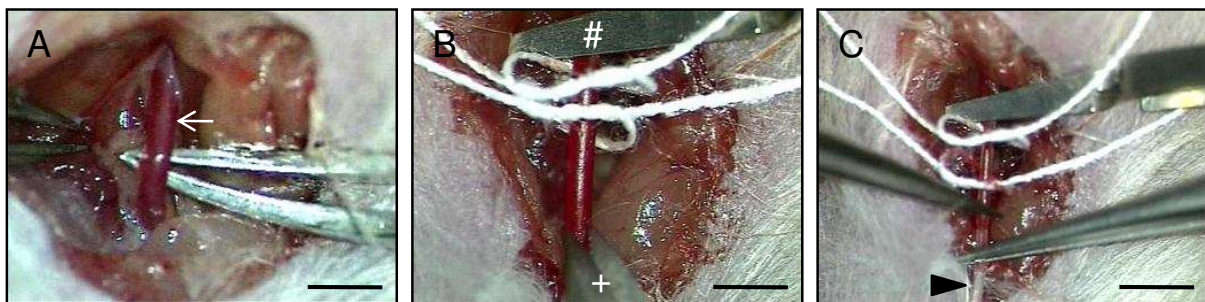
### 5.3 Färbung der Bakterien

Um die Interaktion von *S. aureus* mit dem Gefäßendothel in vivo analysieren zu können, erfolgte die Färbung von Staphylokokken mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC; 20mg/ml Ethanol Stammlösung; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Für diesen Zweck wurde *S. aureus*, Cowan 1 (ATCC 12598) in 5ml Müller-Hinton-Brühe (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich) unter konstanter Rotation für eine Dauer von 6 Stunden bei 37°C (späte exponentielle Wachstumsphase) kultiviert. Anschließend wurde 1ml dieser Kultur in 1ml sterilem 0,9% NaCl gewaschen. Für die eigentliche Färbung der Bakterien wurde das Pellet unter konstanter Rotation (2h) in einer Lösung aus 250µl sterilem NaHCO<sub>3</sub> (0,1 Mol; pH 9,0) und FITC (100µg/ml) resuspendiert. Die nun angefärbten Bakterien wurden danach dreimal in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gewaschen, um den nicht an Bakterien gebundenen Farbstoff zu entfernen.

Normalerweise sind aktive Staphylokokken in der Lage, verschiedene Exotoxine zu bilden [Dryden, 2009]. Diese wiederum können unterschiedliche Effekte sowohl auf die Integrität, als auch auf den Aktivierungsstatus des Endothels ausüben. Um diese ungewollten Effekte zu vermeiden, wurden die Bakterien in einem nächsten Schritt inaktiviert. Vorangegangene Studien zeigten bereits, dass die Inaktivierung der Mikroorganismen keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten am Endothel hat und somit die erlangten Ergebnisse als repräsentativ für lebende *S. aurei* gesehen werden können [Sinha et al., 1999; Sinha et al., 2000]. Die Inaktivierung der gefärbten Staphylokokki erfolgte in einer Lösung von 500µl PBS/1% Formaldehyd unter konstanter Rotation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Bakterien erneut dreimal in PBS gewaschen und das so erhaltene Pellet in 1ml steriler PBS/1% Bovinem Serum Albumin (BSA) Lösung resuspendiert. Die auf diese Weise erhaltene Bakteriensuspension konnte für einen Zeitraum von ca. 2 Tagen bei Kühlschranktemperatur ohne Beeinträchtigung der Fluoreszenzeigenschaften der Bakterien aufbewahrt werden.

## 5.4 Katheterimplantation

Die Applikation der gefärbten Bakterien und der Fluoreszenz-Farbstoffe für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit Hilfe eines intraarteriellen Katheters in der A. carotis. Die Implantation des Katheters wurde in Narkose an den in Rückenlage fixierten Versuchstieren durchgeführt. Nach Desinfektion des Operationsfeldes wurde der Hals paratracheal rechtsseitig in einer Länge von ca. 10mm eröffnet.



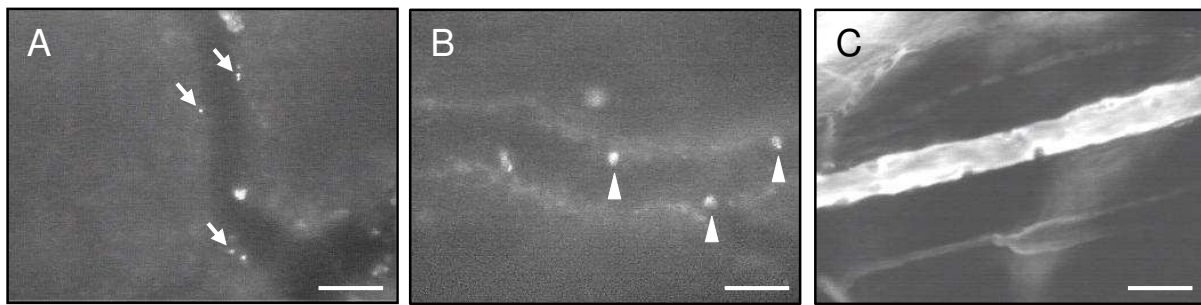
**Abbildung 7:** Implantation eines Katheters in die A. carotis. Nach Darstellung der Arterie (A, Pfeil) erfolgte die distale Ligatur und der proximale Verschluss mittels Gefäßclip (B, #). Anschließend wurde die Arterie mittels Mikroschere (+) inzidiert (B) und der Katheter eingeführt (C, Pfeilspitze). Die Fixierung des Katheters erfolgte mit Hilfe der vorgelegten Ligaturen. Maßstäbe: A, B=2,6mm; C=4,6mm.

Anschließend wurde die A. carotis operativ dargestellt (Abbildung 7 A) und nach kranial mit 5.0 Seide-Faden ligiert. Für den vorübergehenden kaudalen Verschluss der Arterie wurde ein Gefäßclip auf das Gefäß gesetzt (Abbildung 7 B). Danach wurde das Gefäß zwischen Gefäßclip und Ligatur inzidiert (Abbildung 7 B) und ein dünner Polyethylen-Katheter (PE10, 0,28mm innerer Durchmesser) implantiert (Abbildung 7 C). Dieser wurde mit Hilfe von 5.0 Seide-Fäden im Gefäß fixiert. Anschließend konnte der Gefäßclip wieder entfernt und der Hautschnitt mit einer fortlaufenden Naht verschlossen werden.

## 5.5 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Technik der intravitale Fluoreszenzmikroskopie erlaubt es, am lebenden Tier FITC-markierte *S. aurei* (Abbildung 8 A) und Rhodamin 6G-markierte Leukozyten in der Mikrozirkulation (Abbildung 8 B) zu visualisieren. Darüber hinaus können auch mikrohämodynamische Parameter wie Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit quantifiziert werden.



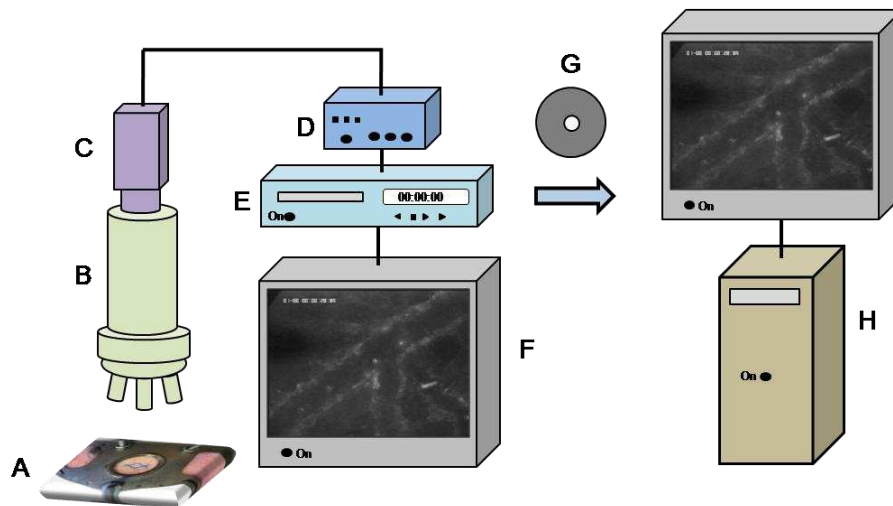


**Abbildung 8:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von postkapillären Venolen mit am Endothel adhärenenten FITC-gefärbten *S. aurei* in Blaulicht-Epi-Illumination (A, Pfeile) bzw. Rhodamin-gefärbten Leukozyten in Grünlicht-Epi-Illumination (B, Pfeilspitzen). Die Darstellung des Blutplasmas innerhalb der Gefäße erfolgte mit Hilfe von FITC-Dextran (MW 150.000) in Blaulicht-Epi-Illumination (C) und erlaubte die exakte Darstellung der Geometrie des Gefäßes. Maßstäbe= 40µm.

Die anästhesierten Versuchstiere wurden nach Implantation des Katheters in die A. carotis auf dem Mikroskoptisch in Seitenlage positioniert. Anschließend erfolgte die intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Jedem Versuchstier wurden dafür  $10^9$  FITC-markierte Bakterien arteriell appliziert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien im Blutkreislauf zu gewährleisten, wurde die intravitalmikroskopische Analyse erst 5 Minuten nach Applikation gestartet. Die Anfärbung der Leukozyten in vivo wurde mit 0,1ml 0,1% Rhodamin 6G (Molekulargewicht 479D; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Darstellung der Gefäßgrenzen und der Blutzellgeschwindigkeit innerhalb der Gefäße durch die Anfärbung des Blutplasmas mit 0,1ml 5% FITC-Dextran (Molekulargewicht 150kD; Fluka Biochemika, Ulm, Deutschland).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zeiss Axiotech Mikroskop (Zeiss; Oberkochen, Deutschland) verwendet, das mit einer 100 Watt Quecksilberdampflampe ausgestattet war. Drei zuschaltbare Filterblöcke ermöglichten eine Ausleuchtung des Beobachtungsfeldes mit blauem (450-490nm Wellenlänge), grünem (530-560nm Wellenlänge) und ultraviolettem (330-390nm Wellenlänge) Licht. Gleichzeitig wurden die emittierten Lichtstrahlen auf >520nm (blau), >580nm (grün) und >430nm (ultraviolett) Wellenlänge gefiltert. Die Aufnahme der mikroskopischen Bilder erfolgte mit Hilfe einer „charge coupled device“ (CCD) Videokamera (FK6990, Pieper; Schwerte, Deutschland), die an einen DVD-Rekorder (DVD R121; Samsung Group; Seoul; Südkorea) angeschlossen war. Zwischen Kamera und Aufnahmegerät war ein Videotimer (VTG 33; FOR-A Company Ltd., Japan) zwischengeschaltet. Dieser ermöglichte es, die Nummer des Versuchstieres und die Zeit nach erfolgter Bakterienapplikation zu dokumentieren (Abbildung 9). Während der Mikroskopie erfolgte die Darstellung der mikroskopischen Bilder auf einem 14 Zoll Monitor

(KV-14CT1E, Sony; Tokyo, Japan), wobei mit Hilfe eines 5x Objektivs (numerische Apertur (n.A.) = 0,15), eines 10x Objektivs (n.A. = 0,3), eines 20x Objektivs (n.A. = 0,4) und eines 50x Objektivs (n.A. = 0,55) Vergrößerungen von x115, x215, x430 und x1150 erreicht wurden.



**Abbildung 9:** Schematischer Aufbau eines intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes. Die Rückenhautpräparation (A) wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop (B) positioniert. Vom Mikroskop erfolgte die Bildübertragung durch eine CCD-Kamera (C) über einen Videotimer (D) an den Monitor (F) und das Aufnahmegerät (E). Die Auswertung des aufgenommenen Datenträgers (G) wurde später mit Hilfe des Computer-assistierten Analysesystems CapImage (H) off-line durchgeführt.

### 5.5.1 Mikrovaskuläre Parameter

Die Auswertung der intravitalmikroskopischen Bilder erfolgte ausschließlich off-line (Abbildung 9). Dies bedeutet, dass die auf DVD aufgenommenen mikroskopischen Bilder zu einem späteren Zeitpunkt erneut abgespielt und mit Hilfe eines computergestützten Bildverarbeitungsprogramms (CapImage, Version 6.02, Dr. Zeintl Ingenieurbüro; Heidelberg, Deutschland) analysiert wurden. Diese Methode bietet den großen Vorteil, dass die Untersuchungszeit für das einzelne Versuchstier auf ein Minimum reduziert und damit die Belastung für das Tier relativ gering gehalten werden kann.

#### 5.5.1.1 Gefäßdurchmesser

Durch die FITC-Dextran-Anfärbung des Blutplasmas war es möglich, die exakten Gefäßgrenzen zu visualisieren. Für die Bestimmung des Gefäßdurchmessers wurden senkrecht zur Gefäßinnenwand die Randpunkte des Gefäßes markiert und so der Durchmesser in  $\mu\text{m}$  bestimmt.

### 5.5.1.2 Blutzellgeschwindigkeit

Die Bestimmung der Blutzellgeschwindigkeit in einzelnen Gefäßen erfolgte computerassistent mit Hilfe der Line-Shift-Diagramm-Methode [Klyscz et al., 1997]. Bei dieser Methode wird während der Auswertung eine Linie, die der Flussrichtung des Blutstromes folgt, zentral im Gefäßlumen eingezeichnet. Anschließend wird der Bildträger für 10s in Echtzeit abgespielt. Während dieser Zeit ermittelt das Computerprogramm für jedes Halbbild die Grauwerte an der Messlinie und speichert diese in einem Bildspeicher ab. In einem nächsten Schritt werden die unterschiedlichen Grauwertprofile über die Zeit dann in einem Line-Shift-Diagramm angezeigt, das aus einer Vielzahl von schrägen Linien mit unterschiedlichen Grautönen besteht. Die Unterschiede dieser Grauwerte kommen dadurch zustande, dass durch die Anfärbung des Blutplasmas sich Blutplasma und Blutzellen in unterschiedlichen Helligkeitsstufen darstellen, die bei der Auswertung entlang der Messlinie erfasst werden. Aus der Steigung dieser Grauwertlinien kann die Geschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ ) der Blutzellen ermittelt werden.

### 5.5.1.3 Mikrovaskulärer Blutfluss

Die Berechnung des mikrovaskulären Blutflusses ergibt sich durch Multiplikation der Blutzellgeschwindigkeit mit dem Querschnitt des betrachteten Gefäßes. Allerdings kommt es beim Durchtritt von Flüssigkeiten durch röhrenförmige Gebilde zu höheren Fließgeschwindigkeiten in den zentralen Bereichen verglichen mit wandnahen Bereichen [Baker und Wayland, 1974]. Da in der vorliegenden Arbeit die Erfassung der Blutzellgeschwindigkeit mit Hilfe der Line-Shift-Diagramm-Methode in zentralen Anteilen des Blutstromes erfolgte, hätte daher ohne entsprechende Korrektur eine Überschätzung des Blutflusses stattgefunden.

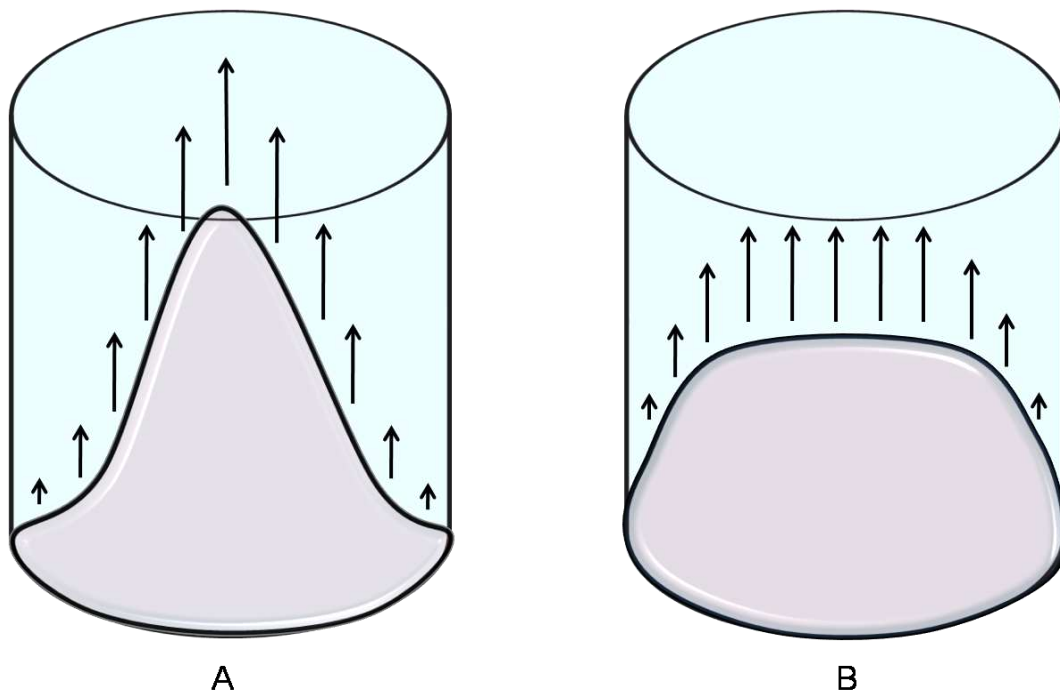
Bei Newtonschen Flüssigkeiten nimmt das Flussprofil beim Durchtritt durch ein röhrenförmiges Gebilde eine paraboloidale Form an (*Abbildung 10 A*). Blut hingegen zählt aufgrund der korpuskulären Bestandteile zu den nicht-Newtonschen Flüssigkeiten, wodurch eine nicht-lineare Beziehung zwischen wirkender Schubspannung und resultierendem Schergrad mit einem angestumpften Flussprofil entsteht (*Abbildung 10 B*). Somit mussten die erhobenen Werte für den mikrovaskulären Blutfluss mit Hilfe des Baker-Wayland Proportionalitätsfaktors korrigiert werden. Dieser berücksichtigt sowohl die Tatsache, dass die Fließgeschwindigkeit im Zentralstrom des Blutflusses erfasst wurde, als auch das abgestumpfte Flussprofil von nicht-Newtonschen Flüssigkeiten. Da die erfassten Gefäßdurchmesser zwischen 20 und 40  $\mu\text{m}$  betrugen, ergab sich für den

Proportionalitätsfaktor ein Wert von 1,6 [Baker und Wayland, 1974].

Die Formel zur Berechnung des mikrovaskulären Blutflusses lautete:

$$\text{Mikrovaskulärer Blutfluss} = \pi \cdot (d/2)^2 \cdot v / K$$

$d$ =Gefäßdurchmesser;  $v$ =Blutzellgeschwindigkeit;  $K$ = Baker-Wayland Proportionalitätsfaktor



**Abbildung 10:** Darstellung des Flussprofils in röhrenartigen Gebilden. Der Fluss von Newtonschen Flüssigkeiten in Gefäßen zeigt ein paraboloides Profil (A). Bei nicht-Newtonschen Flüssigkeiten -wie beispielsweise Blut- stellt sich ein abgeflachtes Flussprofil ein (B).

#### 5.5.1.4 Scherrate

Wie bereits in Kapitel 5.5.1.3 beschrieben, unterscheiden sich die Fließgeschwindigkeiten von Flüssigkeiten in röhrenförmigen Gebilden je nach Abstand zur Gefäßwand. Verursacht wird dies durch die Reibungskräfte, die durch den Fluß am Gefäßendothel wirken. Die Scherrate berechnet sich nach der Newton'schen-Gleichung aus der Blutzellgeschwindigkeit im Zentrum und dem Gefäßdurchmesser:

$$\text{Scherrate} = 8 \cdot v / d$$

$v$ =Blutzellgeschwindigkeit;  $d$ =Gefäßdurchmesser



### 5.5.1.5 Gefäßwandpermeabilität

Mit Hilfe des hochmolekularen Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran ist es möglich, Veränderungen der Gefäßwandpermeabilität zu quantifizieren. Dadurch kann die Integrität des Gefäßendothels beurteilt werden. Dies wiederum liefert Hinweise auf angiogene Prozesse oder ablaufende inflammatorische Reaktionen. Unter normalen Umständen bleibt FITC-Dextran aufgrund seines hohen Molekulargewichts (150 kD) im intravasalen Raum. Bei Entzündung oder Angiogenese kann es jedoch zu einer Erhöhung der Gefäßwandpermeabilität mit verstärktem Austritt des Farbstoffs in das paravasale Gewebe kommen. Mit Hilfe der Densitometrie können Grauwerte des paravasalen Gewebes zu den Grauwerten des Blutplasmas ins Verhältnis gesetzt und ein entsprechender Quotient berechnet werden [Pries, 1988]. Unter physiologischen Bedingungen sollte dieser Quotient 0,2-0,3 betragen, während der Wert im Rahmen einer Entzündung sogar über 1 ansteigen kann.

$$\text{Gefäßwandpermeabilität} = E_1/E_2$$

$E_1$ =Grauwert paravasal;  $E_2$ =Grauwert intravasal

### 5.5.1.6 Adhärente Bakterien

Die Anzahl adhärenter Bakterien wurde in einem venulären Gefäßabschnitt mit einer Länge von 100µm bestimmt. Dabei wurde der Begriff „Adhärenz“ dadurch definiert, dass sich das Bakterium während eines Beobachtungszeitraums von 20s nicht von der Stelle bewegte. Die adhärenenten Bakterien wurden als Zahl adhärenter Bakterien/Fläche Gefäßendothel (mm<sup>2</sup>) angegeben. Die Berechnung erfolgte unter Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie mit Hilfe des Gefäßdurchmessers nach der Formel:

$$\text{Bakterien/mm}^2 = n / \pi \cdot d \cdot 100 \cdot 10^{-6}$$

$n$ =Anzahl Bakterien;  $d$ =Gefäßdurchmesser

Zusätzlich erfolgte die Analyse der Anzahl von adhärenenten Bakterien innerhalb des Kapillarnetzwerkes um das Netzimplantat. Hierzu wurden alle Bakterien eines Beobachtungsfeldes gezählt, wobei dieses dem sichtbaren Ausschnitt des Kapillarnetzwerkes auf dem Monitor bei einer Vergrößerung von x430 entsprach. Die Anzahl der adhärenenten Bakterien innerhalb dieses Kapillarnetzwerkes wurde in Bakterien/Beobachtungsfeld wiedergegeben.

### 5.5.1.7 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Leukozyten wurden gemäß ihrer Interaktion mit dem Gefäßendothel in zwei Gruppen unterteilt. Rollende Leukozyten kennzeichnen sich dadurch, dass sie aufgrund von Margination und kurzzeitiger Bindung an das Endothel an der Gefäßinnenwand entlang „rollen“. Entsprechend wurden Leukozyten als „rollend“ definiert, die sich mit weniger als 1/5 der Blutzellgeschwindigkeit fortbewegten. Die Ergebnisse wurden dabei als die Zahl rollender Leukozyten pro Minute angegeben, die einen Referenzpunkt innerhalb des Gefäßes passierten. Als adhärenente Leukozyten wurden diejenigen angesehen, die über den Beobachtungszeitraum von 20s fest am Gefäßendothel anhafteten. Die Anzahl adhärenenter Leukozyten ergab sich analog zu der Formel für adhärenente Bakterien in Leukozyten/Gefäßendothel ( $\text{mm}^2$ ) (*siehe auch Kapitel 5.5.1.6*).

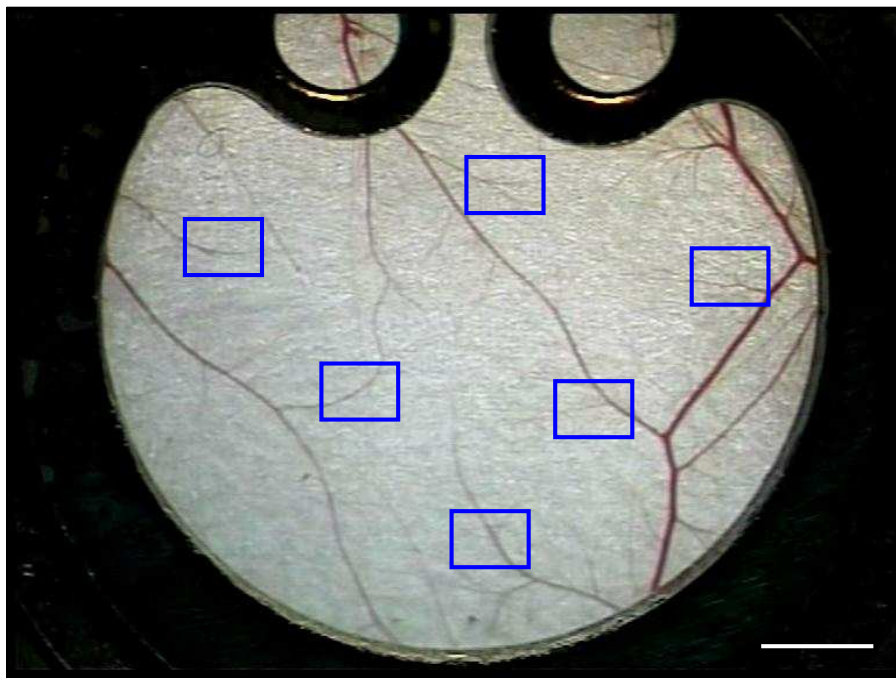
Bei implantiertem Netz erfolgte -analog zu der Bestimmung der adhärenenten Bakterien innerhalb des Kapillarnetzwerkes um das Netzümplantat- die Bestimmung der Anzahl adhärenenter Leukozyten in dem Kapillarnetzwerk pro Gesichtsfeld (*siehe auch Kapitel 5.5.1.6*).

### 5.5.1.8 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte erfasst die Strecke blutperfundierter Kapillaren im Verhältnis zu der ausgewerteten Fläche. Die funktionelle Kapillardichte innerhalb des Granulationsgewebes um die Netzümplantate wurde in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  wiedergegeben.

## 5.6 Mikroskopische Analyse

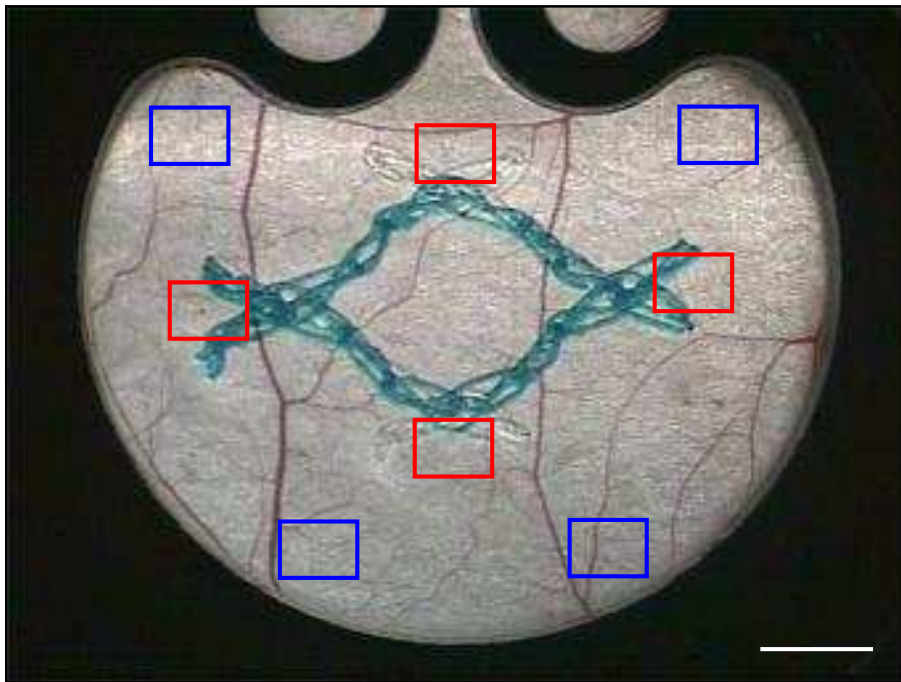
Die Erfassung der mikrovaskulären Parameter erfolgte bei jedem Versuchstier innerhalb von 5-10 Beobachtungsfeldern. In jedem dieser Felder wurden für die Messungen 1-2 postkapilläre Venolen mit einem Gefäßdurchmesser von 20-40 $\mu\text{m}$  herangezogen. Bei Versuchstieren ohne Netzümplantat innerhalb der Rückenhautkammer wurden 5-10 Beobachtungsfelder randomisiert ausgewählt (*Abbildung 11*).



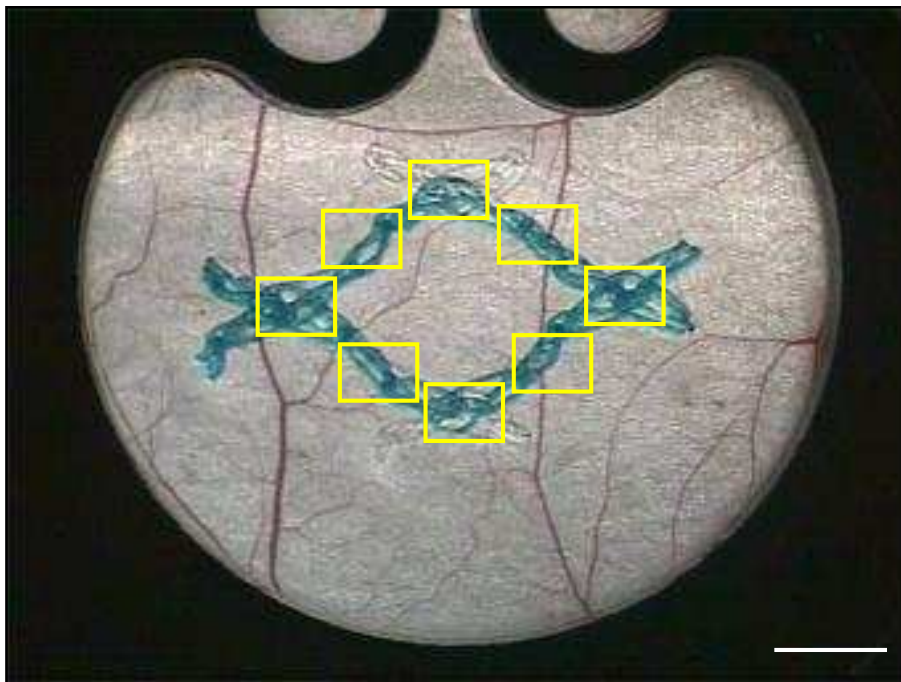
**Abbildung 11:** Rückenhautkammer ohne Netzümplantat mit eingezeichneten Beobachtungsfeldern (blaue Kästchen). In jedem der randomisiert ausgewählten Beobachtungsfelder wurden 1-2 postkapilläre Venolen oder Sammelvenolen mit einem Durchmesser von 20-40µm für die Analysen ausgewählt. Maßstab: 1,6mm.

Bei Versuchstieren, denen ein Ultrapro®-Netz implantiert wurde, erfolgte die Analyse der mikrovaskulären Parameter in 4 Beobachtungsfeldern in direkter Nähe des Netzes und 4 Feldern im umliegenden Empfängergerewebe (*Abbildung 12*). Vergleichbar mit den Versuchstieren ohne Netzümplantat wurden in jedem dieser Beobachtungsfelder für die Messungen 1-2 postkapilläre Venolen mit einem Gefäßdurchmesser von 20-40µm herangezogen.

Zur Analyse der Angiogenese im Granulationsgerewebe, welches sich um das Netzümplantat ausbildete, wurden 8 Beobachtungsfelder im Netzbereich untersucht (*Abbildung 13*). Ein Beobachtungsfeld entsprach dabei dem sichtbaren Ausschnitt auf dem Monitor bei einer Vergrößerung von x430. Von diesen Beobachtungsfeldern wurde zunächst der Anteil Angiogenese-positiver Felder bestimmt, die bereits Zeichen der Blutgefäßneubildung aufwiesen. Wenn bereits neugebildete Gefäße in den Beobachtungsfeldern zu erkennen waren, wurde zusätzlich die Länge der bereits perfundierten Kapillaren pro Fläche ausgewertet und als funktionelle Kapillardichte angegeben. Zusätzlich wurde innerhalb des Kapillarnetzwerks um das Netzümplantat die Anzahl adhärenter Bakterien und Leukozyten bestimmt.



**Abbildung 12:** Rückenhautkammer mit implantiertem Ultrapro®-Netz und eingezeichneten Beobachtungsfeldern für die Analyse der Bakterien- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in postkapillären Venolen und Sammelvenolen. Rote Kästchen entsprechen netznahen Beobachtungsfeldern. Blaue Kästchen repräsentieren netzferne Felder. Maßstab: 1,6mm.



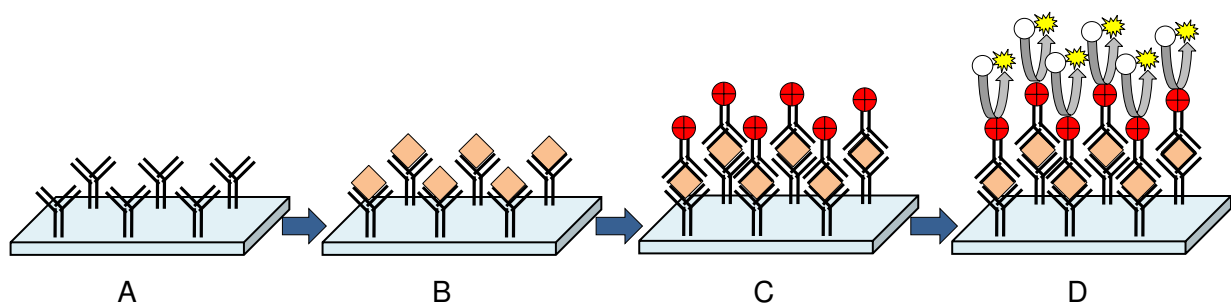
**Abbildung 13:** Rückenhautkammer mit implantiertem Ultrapro®-Netz und eingezeichneten Beobachtungsfeldern für die Analyse der Angiogenese und funktionellen Kapillardichte. Innerhalb der neugebildeten Gefäße wurde zusätzlich die Anzahl adhärenter Bakterien und Leukozyten untersucht. Maßstab: 1,6mm.

## 5.7 Histologie

Am Ende des *in vivo* Experiments wurde die Kammerpräparation vorsichtig zur weiteren histologischen Analyse exzidiert. Anschließend erfolgte die Fixation in 4% Formaldehydlösung und nach 24h die Einbettung in Paraffin. Von jedem histologischen Präparat wurden Serienschnitte mit einer Schnittdicke von 4µm angefertigt. Entsprechend dem histologischen Standardprotokoll folgte die Färbung jedes sechsten Schnittes mit Hämatoxylin-Eosin (HE). Die histologischen Schnitte wurden lichtmikroskopisch (BX60, Olympus, Hamburg, Deutschland) ausgewertet.

## 5.8 Serumkonzentration des Antikörpers 74.5.2

Die Quantifizierung der Serumkonzentration des zirkulierenden Antikörpers 74.5.2 gegen gC1qR erfolgte mittels direktem „Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay“ (ELISA; *Abbildung 14*).



**Abbildung 14:** Messung der Antikörper-Konzentration im Serum der Versuchstiere mittels ELISA. Rekombinanter, löslicher gC1qR wurde auf einer 96-Well-Platte fixiert (A). Der im Testserum enthaltene Antikörper 74.5.2 interagiert mit dem bereits gebundenem gC1qR (B). Nach Zugabe von anti-Maus-IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase (C) erfolgte die photometrische Quantifizierung des gebundenen Antikörpers mit Hilfe eines Chromogens (D).

Dafür wurde rekombinanter, löslicher gC1qR an eine 96-Well-Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend erfolgte die Blockierung der Wells mit 1% BSA. Die Herstellung der Standardreihe des anti-gC1qR Antikörpers (0-10µg/ml) erfolgte in nativem Hamsterserum das mit 0,3M NaCl (1/10) verdünnt war. Analog dazu wurden die Testseren ebenfalls mit 0,3M NaCl verdünnt. Die Testung der Standardreihe und der Testseren erfolgte in unterschiedlichen Wells. Im Anschluss an die 60-minütige Inkubation unter Umgebungstemperatur folgte die Zugabe von Anti-Maus-Immunglobulin mit daran gebundener alkalischer Phosphatase (IgG aus der Ziege; Sigma-Aldrich; Taufkirchen,

Deutschland). Nach Zugabe von p-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Chromogen erfolgte die photometrische Quantifizierung des gebundenen Antikörpers 74.5.2 aus den Testseren (Wellenlänge 450nm). Zur Verifizierung der Testergebnisse wurde jedes Testserum doppelt gemessen und die Ergebnisse in µg/ml Serum angegeben.

## 5.9 Adhärenz-Assay

Die Analyse der Adhärenz von Staphylokokken an Endothelzellen erfolgte in vitro an EA.hy Zellen. Dabei handelt es sich um eine immortalisierte humane Endothelzelllinie. Die verwendeten Zellen wurden durch Trypsin von der Kulturschale losgelöst. Direkt im Anschluss daran wurden die Zellen mit FITC-gefärbten Bakterien in Kontakt gebracht. Hiervon wurden nach 5, 15, 30 und 90 Minuten Proben entnommen und mittels Flow-Zytometrie der Anteil FITC-positiver Zellen analysiert (FACS Calibur und CellQuest Pro Software, Becton Dickson; Heidelberg, Germany). Die Versuche erfolgten sowohl bei unstimulierten als auch TNF-α stimulierten Zellen einmal mit dem monoklonalen Antikörper 74.5.2 (500µg/ml) und als Kontrolle mit Serum-freiem Medium (+10% FCS). Alle Versuchsansätze wurden dreifach durchgeführt.

## 5.10 Versuchsprotokoll

### 5.10.1 Inhibition der Interaktion von *S. aureus* mit dem mikrovaskulären Endothel durch die Blockade von gC1qR/p33

Für diesen Studienabschnitt wurde bei 25 Hamstern eine Rückenhautkammer präpariert. Nach 48 Stunden wurde den Tieren entweder der monoklonale Antikörper 74.5.2 (n=13; 100mg/kg KG in Serum-freiem Medium) oder Vehikel (n=12; Serum-freies Medium) in äquivalenter Dosierung intraperitoneal injiziert. Nach weiteren 48h wurde bei einem Teil der Hamster (Antikörper: n=7; Vehikel: n=7) eine Entzündung mittels topischer Applikation von TNF-α auf das Kammergewebe (2000U in 100µl PBS; 30 Minuten) induziert. Um den Einfluss einer Blockade von gC1qR unter nicht-entzündlichen Bedingungen zu analysieren, wurde bei den restlichen Versuchstieren (Antikörper: n=6; Vehikel: n=5) PBS topisch auf die Kammerpräparation appliziert (100µl; 30 Minuten). Anschließend wurden den Versuchstieren 10<sup>9</sup> FITC-gefärbte Bakterien über einen Carotis-Katheter verabreicht. Die intravitalmikroskopische Analyse der Bakterien-Endothelzell-Interaktion innerhalb der postkapillären Venolen und Sammelvenolen erfolgte 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten nach

Applikation der Bakterien. Nach abgeschlossener Analyse der Bakterien-Endothelzell-Interaktion wurde jedem Tier 0,1ml FITC-Dextran (5%; Molekulargewicht 150kD; Fluka Biochemika, Ulm, Deutschland) und Rhodamin-6G (0,1ml; 0,1%) appliziert, um mikrohämodynamische Parameter und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion innerhalb der analysierten Gefäße erfassen zu können

### **5.10.2 Einfluss chirurgischer Netzümplantate auf die Interaktion von *S. aureus* mit dem mikrovaskulären Endothel**

Für diesen Studienabschnitt wurde bei 19 Syrischen Goldhamstern eine Rückenhautkammer präpariert. Im Anschluss daran konnten sich die Versuchstiere für 48 Stunden von dem chirurgischen Trauma und der Anästhesie erholen. Danach erfolgte die Implantation der Ultrapro®-Netze in die Rückenhautkammer. Die intravitalmikroskopische Untersuchung erfolgte 12 Tage nach Implantation des chirurgischen Netzes. Frühere Studien haben gezeigt, dass zu diesem Zeitpunkt das Granulationsgewebe um das Implantat bereits ausreichend vaskularisiert ist [Laschke et al., 2005a].

Nach Implantation eines Carotis-Katheters wurden 8 Hamstern  $10^9$  FITC-gefärbte *S. aurei* sowie Rhodamin-6G (0,1ml 0,1%) appliziert. Fünf Minuten nach der intraarteriellen Applikation erfolgte die intravitalmikroskopische Analyse der Bakterien-Endothelzell-Interaktion innerhalb der postkapillären Venolen und des Kapillarnetzwerkes um das Netzümplantat. Eine Stunde nach Applikation der Bakterien wurde eine Entzündung des Kammergewebes mittels topischer Applikation von TNF- $\alpha$  (2000 Units in 100 $\mu$ l PBS; 30 Minuten) induziert. Für die Analyse der Bakterien-Endothelzell-Interaktion unter inflammatorischen Bedingungen, wurden nun erneut  $10^9$  FITC-gefärbte *S. aurei* appliziert und nach fünf Minuten mikroskopiert. Zusätzlich wurde zu jedem Zeitpunkt die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion erfasst. Um analysieren zu können, ob *S. aureus* einen Einfluss auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion innerhalb der postkapillären Venolen und des Kapillarnetzwerkes um das Netzümplantat hat, wurde als Referenz eine Gruppe mit 11 Tieren untersucht, die keine Bakterien appliziert bekommen hatten. Zu Ende des Experiments wurde jedem Tier 0,1ml FITC-Dextran (5%; Molekulargewicht 150KD; Fluka Biochemika; Ulm, Deutschland) appliziert um einen Einfluss der Bakterien auf die mikrohämodynamischen Parameter innerhalb der postkapillären Venolen zu erfassen.

## 5.11 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte zusammen mit dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben (Mittelwert $\pm$ SEM). Die entsprechenden Messwerte eines Versuchstieres wurden dabei jeweils zu einem einzelnen Mittelwert zusammengefasst.

Bei Normalverteilung der Werte errechneten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe mit Hilfe des Student's t-Test für unverbundene Werte. Falls die Voraussetzungen für einen t-Test nicht erfüllt waren, erfolgte der Vergleich von Behandlungs- und Kontrollgruppe mittels Mann-Whitney-U-Test.

Für die Analyse von Unterschieden innerhalb einer Versuchsgruppe, die durch eine Behandlung (beispielsweise die topische Applikation von TNF- $\alpha$ ) hervorgerufen wurden, wurde ein Student's t-Test für gepaarte Proben verwendet.

Zeiteffekte innerhalb einer Gruppe wurden bei Normalverteilung der Werte mit Hilfe einer „Multivariate Analysis of Variance“ (ANOVA) getestet. Falls keine Normalverteilung der Werte vorlag, erfolgte die Testung von statistisch signifikanten Unterschieden mittels Friedman Rangvarianz Analyse, gefolgt von einem Wilcoxon Paar Test. Die Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers für Messwiederholungen bzw. multiple Vergleiche wurde nach Bonferroni durchgeführt.

Sämtliche statistische Analysen erfolgten mit Hilfe des Software Packets SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, Ca, USA). Unterschiede wurden ab einem Wert von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen und sind in den Abbildungen entsprechend gekennzeichnet.



## 6. ERGEBNISSE

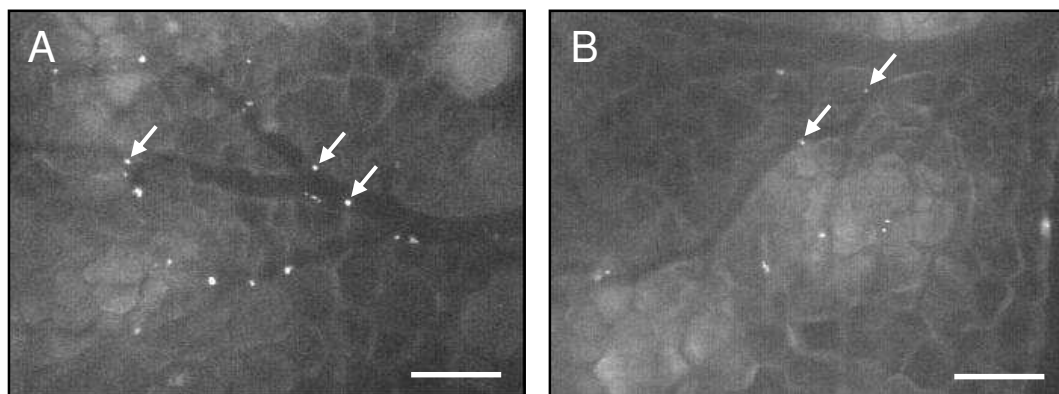
### 6.1 Bedeutung von gC1qR/p33 für die Interaktion von *S. aureus* mit dem mikrovaskulären Endothel

#### 6.1.1 Serumkonzentration des Antikörpers 74.5.2

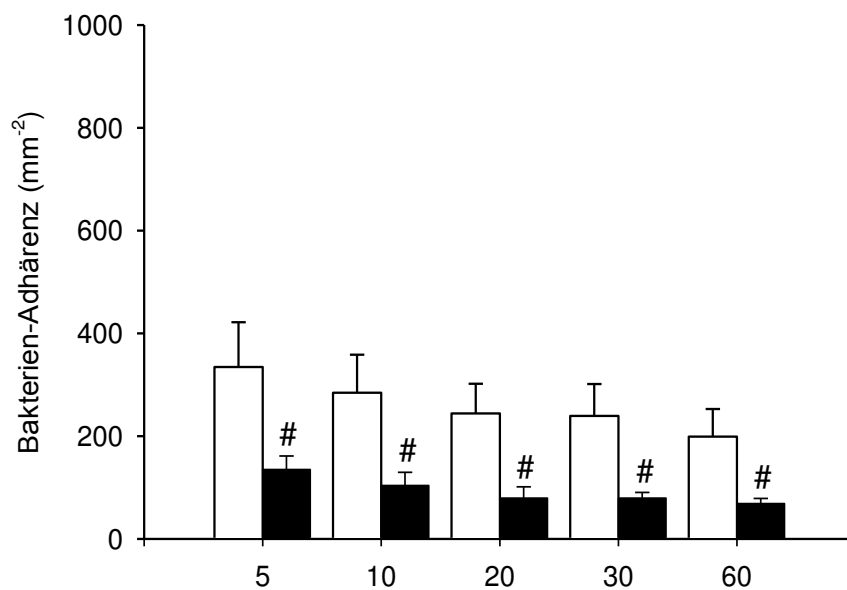
48 Stunden nach Applikation des monoklonalen Antikörpers 74.5.2 erfolgte die Kontrolle der Serumkonzentration mittels ELISA. Bei Versuchstieren, die eine intraperitoneale Injektion (100mg/kg) des Antikörpers erhalten hatten, betrug die Serumkonzentration  $109 \pm 23 \mu\text{g/ml}$ . Im Gegensatz dazu wiesen Kontrolltiere, denen kein Antikörper appliziert wurde, wie zu erwarten war eine Serumkonzentration von  $0 \pm 0 \mu\text{g/ml}$  auf ( $p < 0,05$ ).

#### 6.1.2 Adhärente Bakterien

Die Anzahl adhärenter Bakterien in den postkapillären Venolen und Sammelvenolen der Rückenhautkammer betrug innerhalb des Untersuchungszeitraumes  $200\text{--}335 \text{mm}^{-2}$ . Im Gegensatz dazu führte die Blockade von gC1qR durch den monoklonalen Antikörper 74.5.2 zu einer signifikanten Reduktion der Adhärenz von *S. aureus* am venulären Endothel ( $70\text{--}135 \text{mm}^{-2}$ ;  $p < 0,05$ ; *Abbildung 15, 16*).

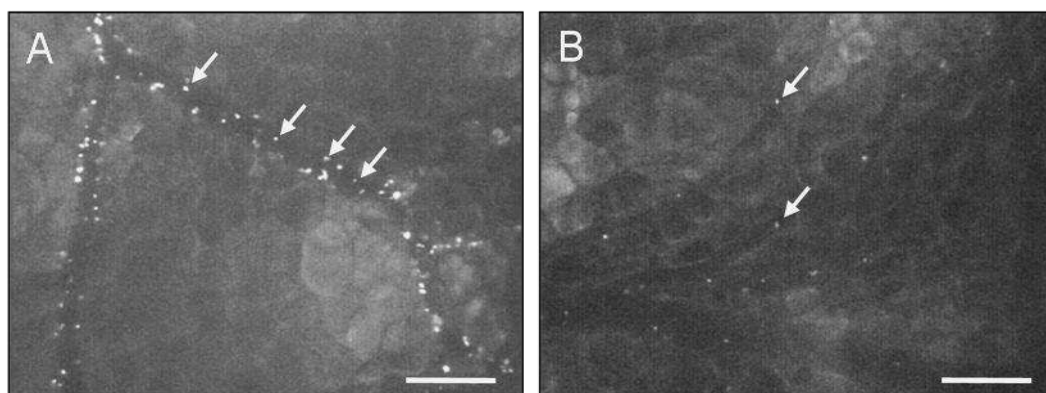


**Abbildung 15:** A, B: Intravitalmikroskopische Bilder von postkapillären Venolen und Sammelvenolen 5 Minuten nach Injektion von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aurei* (Pfeile) in einen Syrischen Goldhamster, der mit Antikörper gegen gC1qR behandelt wurde (B) und einem Kontrolltier (A). Blaulicht-Epi-Illumination, Maßstäbe=115  $\mu\text{m}$ .

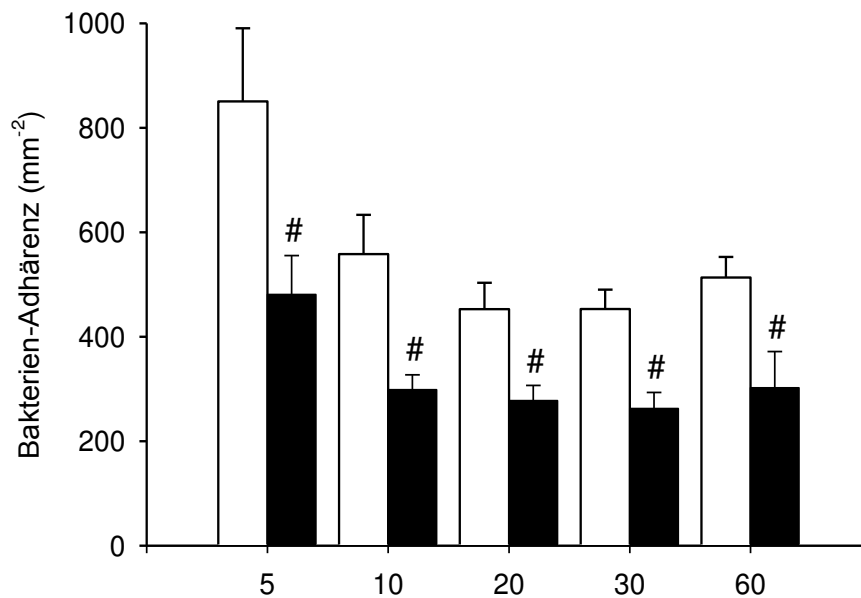


**Abbildung 16:** Adhärenente Bakterien in postkapillären Venolen und Sammelvenolen 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten nach Injektion von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aurei* in Syrische Goldhamster, die mit Antikörper gegen gC1qR behandelt wurden (schwarze Balken) und Kontrolltieren (weiße Balken). Die Blockade von gC1qR bewirkte über den gesamten Beobachtungszeitraum eine signifikante Reduktion der Anzahl adhärenenter Bakterien innerhalb der postkapillären Venolen und Sammelvenolen im Vergleich zu Kontrolltieren. Mittelwert  $\pm$ SEM. # $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Die Induktion einer Inflammation innerhalb der Rückenhautkammer mittels TNF- $\alpha$  steigerte die Bakterien-Adhärenz am Endothel der Venolen ( $\sim 515$ - $850 \text{ mm}^2$ ). Wiederum war durch die Inhibition von gC1qR durch den monoklonalen Antikörper 74.5.2 die Anzahl adhärenenter Bakterien zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant reduziert ( $\sim 260$ - $480 \text{ mm}^2$ ; *Abbildung 17, 18*).



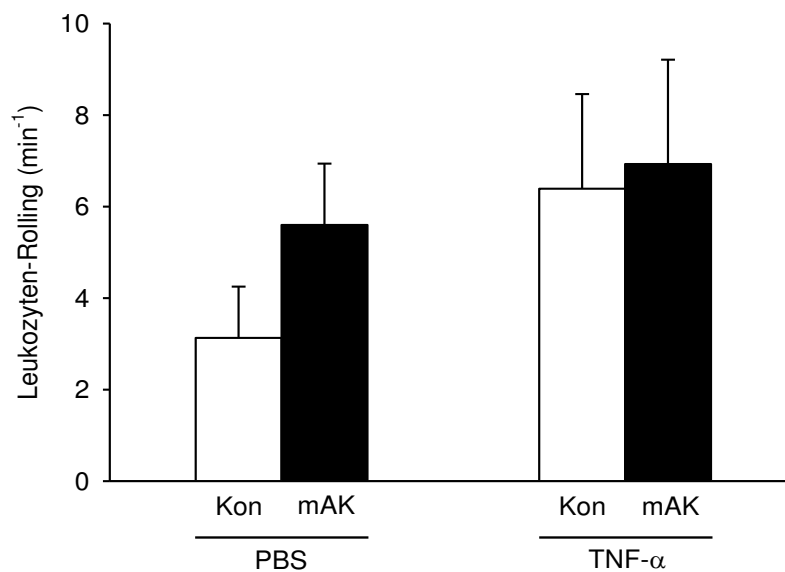
**Abbildung 17:** A, B: Intravitalmikroskopische Bilder von postkapillären Venolen und Sammelvenolen unter entzündlichen Bedingungen 5 Minuten nach Injektion von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aurei* (Pfeile) in einen Syrischen Goldhamster, der mit dem Antikörper gegen gC1qR behandelt wurde (B) und einem Kontrolltier (A). Blaulicht-Epi-Illumination, Maßstäbe= $115 \mu\text{m}$ .



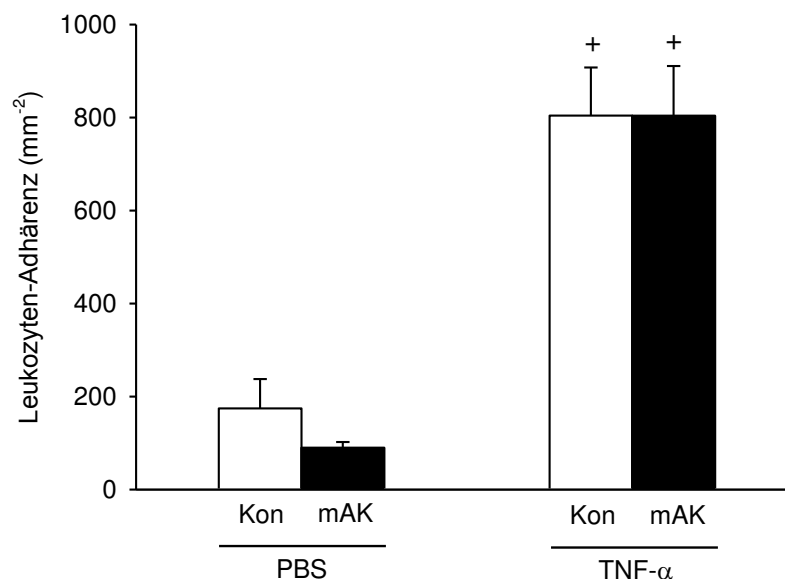
**Abbildung 18:** Adhärenz Bakterien während TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung in postkapillären Venolen und Sammelvenolen 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten nach Injektion von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aurei* in Syrische Goldhamster, die mit Antikörper gegen gC1qR behandelt wurden (schwarze Balken) und Kontrolltieren (weiße Balken). Die Blockade von gC1qR bewirkte eine signifikante Reduktion der Anzahl adhärenter Bakterien innerhalb der postkapillären Venolen und Sammelvenolen im Vergleich zu Kontrolltieren über den gesamten Beobachtungszeitraum. Mittelwerte  $\pm$ SEM. # $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

### 6.1.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

In den Kontrolltieren waren 60 Minuten nach Injektion der Bakterien innerhalb der postkapillären Venolen und Sammelvenolen der Rückenhautkammer  $3,1 \pm 1,1 \text{ min}^{-1}$  rollende Leukozyten zu beobachten. Bei Versuchstieren, die den Antikörper 74.5.2 erhalten hatten, zeigte sich das Leukozyten-Rolling tendenziell erhöht ( $5,6 \pm 1,3 \text{ min}^{-1}$ ), jedoch ohne signifikante Unterschiede (Abbildung 19). Durch die topische Applikation von TNF- $\alpha$  kam es sowohl in der Kontrollgruppe ( $6,4 \pm 2,1 \text{ min}^{-1}$ ) als auch in der Antikörper-behandelten Gruppe ( $6,9 \pm 2,3 \text{ min}^{-1}$ ) zu einer signifikant gesteigerten Anzahl an rollenden Leukozyten. Wiederum zeigte sich jedoch, dass diese Unterschiede zwischen der Antikörper-behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe nicht signifikant waren.



**Abbildung 19:** Leukozyten-Rolling in postkapillären Venolen und Sammelvenolen 60 Minuten nach Injektion von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aurei* in Syrische Goldhamster, die mit Antikörper gegen gC1qR behandelt wurden (schwarze Balken) und Kontrolltieren (weiße Balken). Die Blockade von gC1qR zeigte weder unter nicht-entzündlichen Bedingungen (PBS) noch TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung (TNF- $\alpha$ ) einen signifikanten Einfluss auf das Leukozyten-Rolling in den postkapillären Venolen und Sammelvenolen im Vergleich zu Kontrolltieren. Mittelwerte  $\pm$ SEM.

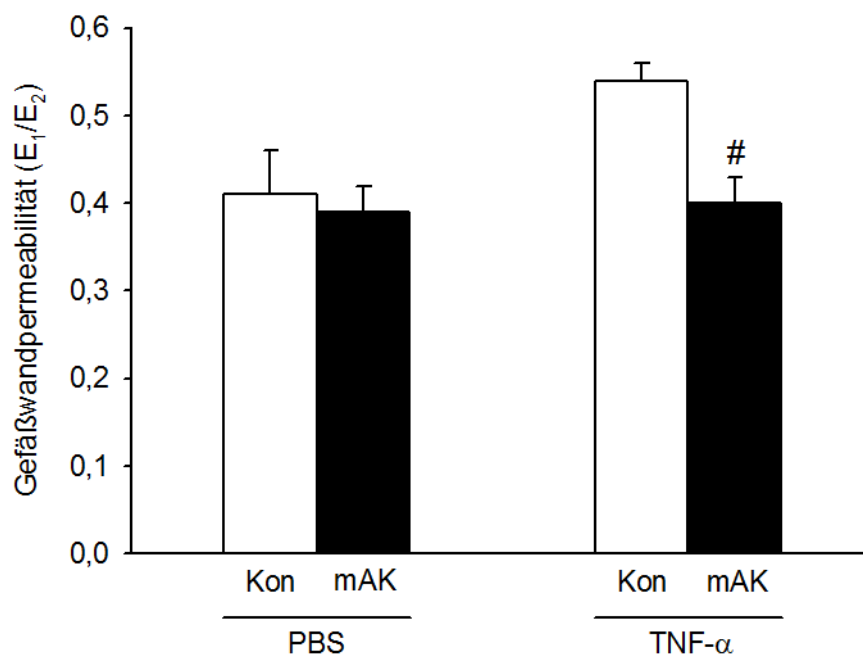


**Abbildung 20:** Leukozyten-Adhärenz in postkapillären Venolen und Sammelvenolen 60 Minuten nach Injektion von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aurei* in Syrische Goldhamster, die mit Antikörper gegen gC1qR behandelt wurden (schwarze Balken) und Kontrolltieren (weiße Balken). Die Blockade von gC1qR zeigte weder unter nicht-entzündlichen Bedingungen (PBS) noch TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung (TNF- $\alpha$ ) einen signifikanten Einfluss auf die Leukozyten-Adhärenz in den postkapillären Venolen und Sammelvenolen im Vergleich zu Kontrolltieren. Mittelwerte  $\pm$ SEM. <sup>+</sup> $p < 0,05$  vs. PBS.

Die topische Applikation von TNF- $\alpha$  führte sowohl bei Antikörper-behandelten Tieren als auch bei Vehikel-behandelten Tieren zu einem signifikanten Anstieg der adhärenenten Leukozyten. Jedoch waren weder unter nicht-entzündlichen noch unter entzündlichen Bedingungen signifikante Unterschiede zwischen Vehikel- ( $174,3 \pm 63,2 \text{ mm}^{-2}$ ;  $804,1 \pm 103,5 \text{ mm}^{-2}$ ) und Antikörper-behandelten Tieren ( $89,6 \pm 12,6 \text{ mm}^{-2}$ ;  $803,7 \pm 107,1 \text{ mm}^{-2}$ ) zu detektieren (Abbildung 20).

#### 6.1.4 Gefäßwandpermeabilität

Die Gefäßwandpermeabilität ( $E_1/E_2$ ) als Maß für die Integrität des Endothels der untersuchten Venolen war unter physiologischen Bedingungen in der Antikörper-behandelten Gruppe ( $0,39 \pm 0,03$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $0,41 \pm 0,05$ ) unverändert. Unter TNF- $\alpha$  induzierter Entzündung war jedoch eine signifikant erniedrigte Gefäßwandpermeabilität bei Antikörper-behandelten Tieren ( $0,40 \pm 0,03$ ) im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren ( $0,54 \pm 0,02$ ) erkennbar (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Gefäßwandpermeabilität von postkapillären Venolen und Sammelvenolen 60 Minuten nach Injektion von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aurei* in Syrische Goldhamster, die mit Antikörper gegen gC1qR behandelt wurden (schwarze Balken) und Kontrolltieren (weiße Balken). Die Blockade von gC1qR bewirkte während TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung (TNF- $\alpha$ ) eine signifikante Reduktion der Gefäßwandpermeabilität von postkapillären Venolen und Sammelvenolen im Vergleich zu Kontrolltieren. Mittelwert  $\pm$ SEM. # $p < 0,05$  vs. Kon.

### 6.1.5 Mikrohämodynamik

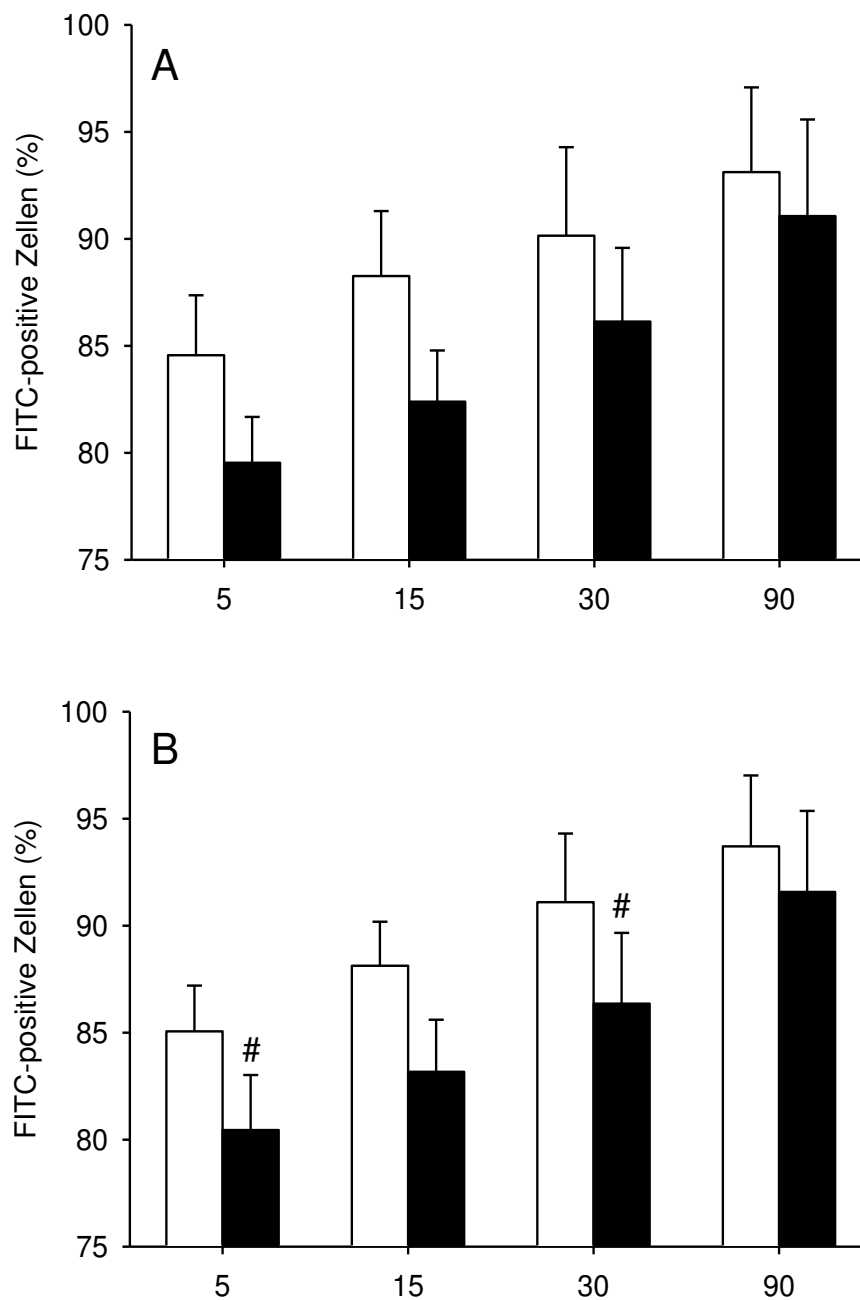
Sowohl unter nicht-entzündlichen Bedingungen als auch TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung wiesen die untersuchten Venolen in der Rückenhautkammer innerhalb beider Versuchsgruppen einen Gefäßdurchmesser von  $\sim 25\mu\text{m}$  auf. Die Blutzellgeschwindigkeit betrug  $\sim 145\text{--}195\mu\text{m/s}$  ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Daraus errechnete sich ein mikrovaskulärer Blutfluss von  $\sim 45\text{--}60\text{pl/s}$  und eine Scherrate von  $\sim 45\text{--}65\text{s}^{-1}$  (Tabelle 3).

	PBS		TNF- $\alpha$	
	Kon	mAK	Kon	mAK
Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	$24,6 \pm 0,5$	$24,3 \pm 2,2$	$26,4 \pm 2,1$	$25,6 \pm 0,6$
Blutzellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ )	$153,5 \pm 32,2$	$193,3 \pm 60,2$	$145,9 \pm 23,1$	$169,6 \pm 31,6$
Mikrovaskulärer Blutfluss (pl/s)	$46,3 \pm 10,7$	$58,1 \pm 17,4$	$52,9 \pm 12,6$	$55,0 \pm 10,6$
Scherrate ( $\text{s}^{-1}$ )	$49,6 \pm 9,9$	$65,1 \pm 21,5$	$45,2 \pm 7,2$	$53,0 \pm 9,7$

**Tabelle 3:** Durchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, mikrovaskulärer Blutfluss und Scherrate in postkapillären- und Sammelvenolen der Rückenhautkammer unter nicht-entzündlichen (PBS) und TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung (TNF- $\alpha$ ). Durch die Applikation des monoklonalen Antikörpers 74.5.2 (mAK) zeigten sich im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren (Kon) keine signifikante Veränderungen mikrohämodynamischer Parameter. Mittelwerte  $\pm$ SEM.

### 6.1.6 Adhärenz-Assay

Der Effekt einer Blockade von gC1qR durch den monoklonalen Antikörper 74.5.2 auf die Bakterien-Adhärenz an humane Endothelzellen in vitro wurde mit Hilfe eines Adhärenz-Assays analysiert. Entsprechend den in vivo Versuchen führte die Behandlung mit dem Antikörper 74.5.2 zu einer Reduktion der Bindung von *S. aureus* an die Endothelzellen. Während die Anzahl FITC-positiver Zellen unter nicht-entzündlichen Bedingungen ohne Antikörper bei  $\sim 85\text{--}93\%$  der Gesamtzellzahl lag, reduzierte der Antikörper die Anzahl FITC-positiver Zellen auf  $\sim 80\text{--}90\%$  (Abbildung 22 A). Vergleichbare Ergebnisse erzielten die Messungen unter Zugabe von TNF- $\alpha$  (Abbildung 22 B). Durch die Inhibition von gC1qR mittels Antikörper ( $\sim 80\text{--}90\%$  FITC-positive Zellen) kam es hier im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $\sim 85\text{--}95\%$  FITC-positive Zellen) ebenfalls zu einer Reduktion der Bindung von *S. aureus* an die Endothelzellen.

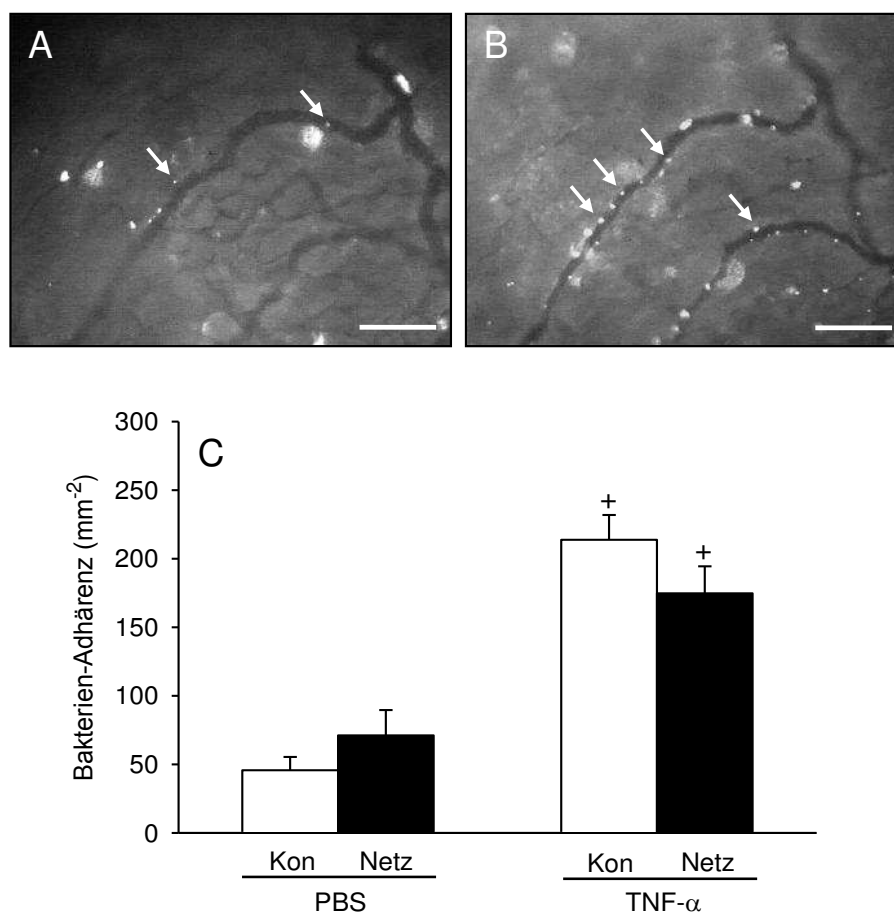


**Abbildung 22:** A, B: In vitro-Adhärenz von *S. aureus* an Endothelzellen 5, 15, 30 und 90 Minuten nach Exposition unter nicht-entzündlichen Bedingungen (A) und TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung (B). Die Blockade von gC1qR (schwarze Balken) reduzierte im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiße Balken) sowohl unter nicht-entzündlichen Bedingungen als auch TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung die Adhärenz der Bakterien an die Endothelzellen. Mittelwert  $\pm$ SEM. # $p < 0,05$  vs. Kontrollgruppe.

## 6.2 Implantation chirurgischer Netze bewirkt keine Interaktion von *S. aureus* mit dem mikrovaskulären Endothel

### 6.2.1 Adhärente Bakterien

Die Anzahl adhärenter Bakterien betrug 5 Minuten nach Injektion von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aurei*  $\sim 45\text{-}70\text{mm}^{-2}$  in den postkapillären Venolen und Sammelvenolen der Rückenhautkammer ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gefäßen in Netznähe und netzfernen Arealen (Abbildung 23).



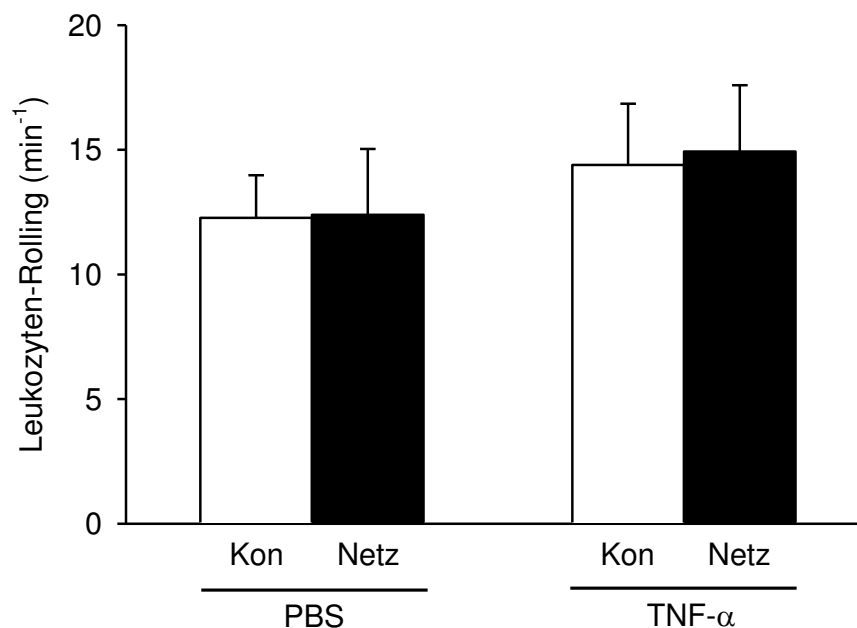
**Abbildung 23:** A, B: Intravitalmikroskopische Bilder von postkapillären Venolen und Sammelvenolen 5 Minuten nach Injektion von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aurei* (Pfeile) in einen Syrischen Goldhamster unter nicht-entzündlichen Bedingungen (A) und TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung (B); Blaulicht-Epi-Illumination, Maßstäbe= $105\mu\text{m}$ . C: Adhärente Bakterien in netznahen Venolen (schwarze Balken) und netzfernen Kontrollvenolen (weiße Balken) 5 Minuten nach Injektion von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aurei*. Das Ultrapro®-Netz führte 12 Tage nach Implantation im Vergleich zur Kontrolle weder unter nicht-entzündlichen Bedingungen (PBS), noch unter entzündlichen Bedingungen (TNF- $\alpha$ ) zu einer gesteigerten Adhärenz von *S. aureus* an das venuläre Endothel. Mittelwert  $\pm$ SEM. \* $p < 0,05$  vs. korrespondierende PBS Gruppe.



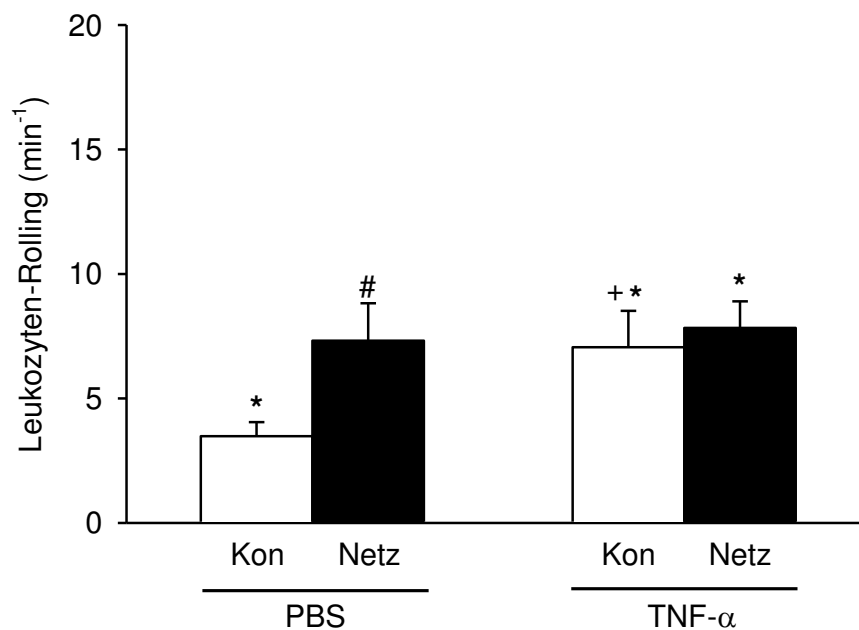
Die Induktion einer Inflammation innerhalb der Rückenhautkammer mittels topischer Applikation von  $\text{TNF-}\alpha$  führte zu einer signifikant verstärkten Bakterien-Adhärenz. Wiederum zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen netznahen Venolen und netzfernen Kontrollvenolen (*Abbildung 23*).

### 6.2.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

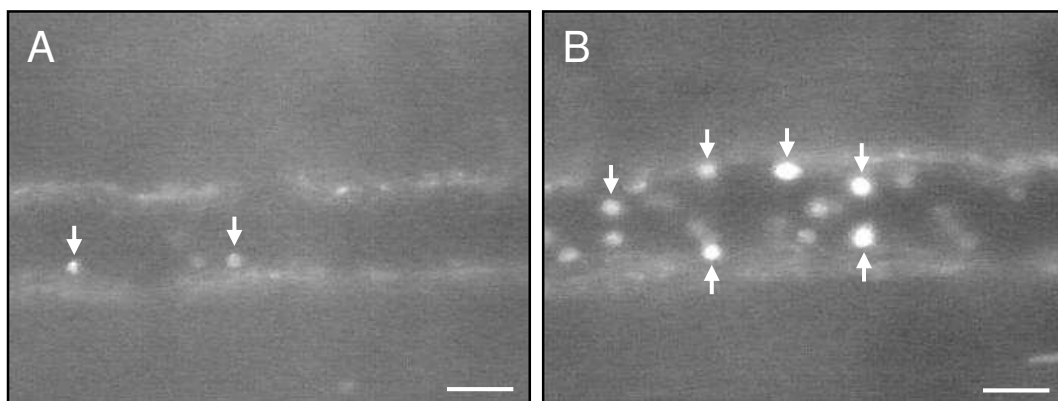
In Versuchstieren, denen kein *S. aureus* appliziert wurde, lag die Anzahl rollender Leukozyten bei  $\sim 12 \text{ min}^{-1}$  ohne signifikante Unterschiede zwischen Venolen in Netznähe und netzfernen Bereichen. Interessanterweise führte auch die topische Applikation von  $\text{TNF-}\alpha$  zu keinem signifikanten Anstieg des Leukozyten-Rolling in diesen Venolen (*Abbildung 24*). Im Gegensatz dazu war die Anzahl rollender Leukozyten in den Tieren, die *S. aureus* erhalten hatten, signifikant erniedrigt (*Abbildung 25*).



**Abbildung 24:** Leukozyten-Rolling ( $\text{min}^{-1}$ ) in postkapillären Venolen und Sammelvenolen ohne vorherige Injektion von *S. aureus* unter nicht-entzündlichen Bedingungen (PBS) und  $\text{TNF-}\alpha$ -induzierter Entzündung ( $\text{TNF-}\alpha$ ). Weder unter nicht-entzündlichen Bedingungen noch  $\text{TNF-}\alpha$ -induzierter Entzündung zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen netznahen Venolen (schwarze Balken) und netzfernen Kontrollvenolen (weiße Balken). Mittelwert  $\pm \text{SEM}$ .



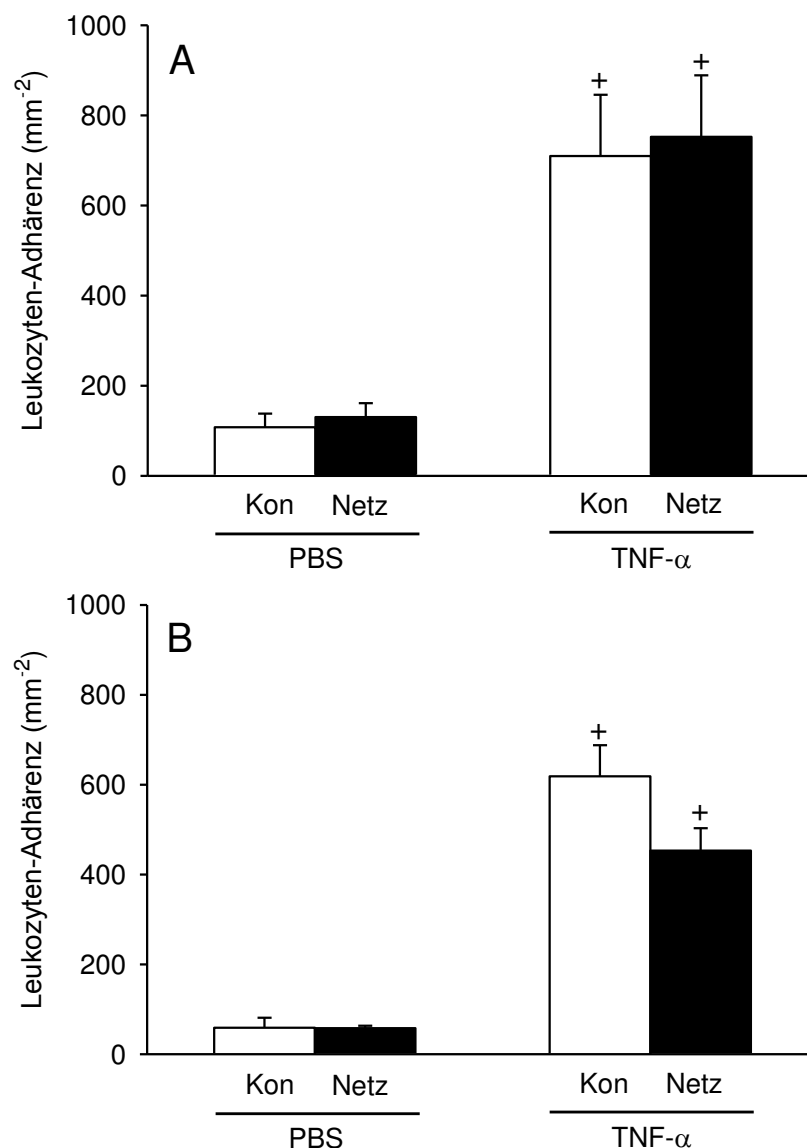
**Abbildung 25:** Leukozyten-Rolling ( $\text{min}^{-1}$ ) in postkapillären Venolen und Sammelvenolen 5 Minuten nach Injektion von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aurei* unter nicht-entzündlichen Bedingungen (PBS) und  $\text{TNF-}\alpha$ -induzierter Entzündung ( $\text{TNF-}\alpha$ ). Verglichen mit der Versuchsgruppe, die keine Bakterien erhalten hatte (Abbildung 24), zeigte sich sowohl in netznahen Venolen (schwarze Balken) als auch in netzfernen Kontrollvenolen (weiße Balken) ein signifikant reduziertes Leukozyten-Rolling. Mittelwert  $\pm$ SEM. \* $p < 0,05$  vs. korrespondierende PBS Gruppe; + $p < 0,05$  vs. ohne Bakterien; # $p < 0,05$  vs. Kon [PBS].



**Abbildung 26:** A, B: Intravitalmikroskopische Bilder einer postkapillären Venole in Netznähe unter nicht-entzündlichen Bedingungen (A) und  $\text{TNF-}\alpha$ -induzierter Entzündung (B). Grünlicht-Epi-Illumination; Maßstäbe:  $30\mu\text{m}$ . Durch die  $\text{TNF-}\alpha$ -induzierte Entzündung kam es zu einem signifikanten Anstieg der adhärenenten Leukozyten.

Die Anzahl adhärenenten Leukozyten lag bei den Versuchstieren, die keine Bakterien injiziert bekommen hatten, bei  $\sim 108\text{-}130\text{mm}^{-2}$  ohne signifikante Unterschiede zwischen netznahen

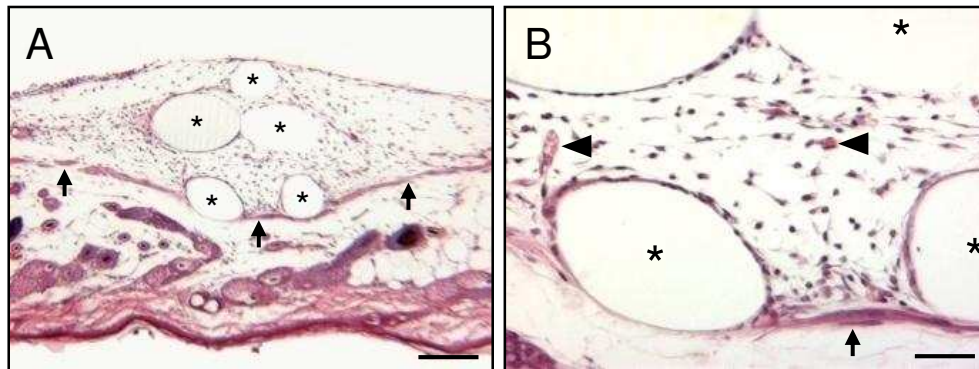
und netzfernen Venolen. Durch die topische Applikation von  $\text{TNF-}\alpha$  war hier ein signifikanter Anstieg auf Werte zwischen  $710\text{-}752\text{mm}^2$  zu beobachten (*Abbildung 26 A, B; Abbildung 27 A*). Vergleichbar zu den Ergebnissen des Leukozyten-Rolling war die Zahl adhärenter Leukozyten bei Tieren, die *S. aureus* injiziert bekommen hatten insgesamt leicht erniedrigt (*Abbildung 27 B*). Wiederum stieg auch hier die Anzahl adhärenter Leukozyten durch die topische Applikation von  $\text{TNF-}\alpha$  signifikant an. Es waren jedoch keine Unterschiede zwischen netznahen und netzfernen Venolen zu beobachten.



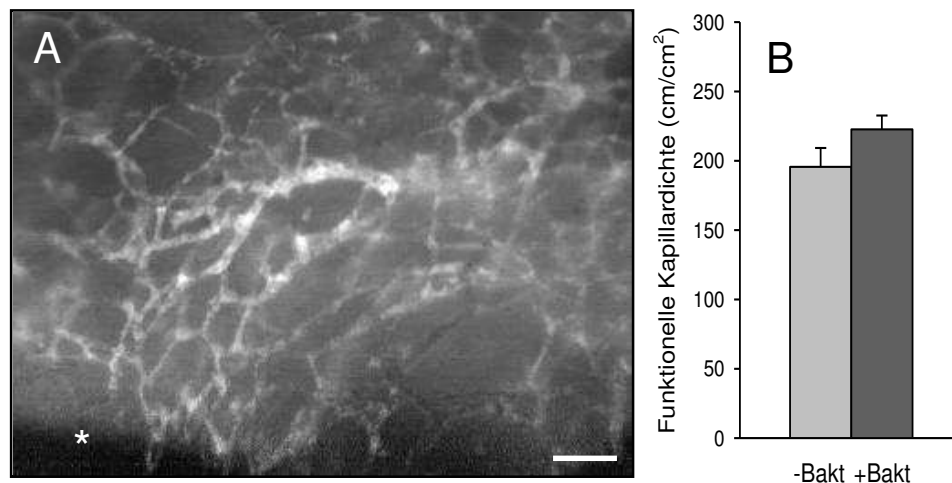
**Abbildung 27:** A, B: Leukozyten-Adhärenz ( $\text{mm}^2$ ) in postkapillären Venolen und Sammelvenolen ohne vorherige Injektion von *S. aureus* (A) und 5 Minuten nach Injektion von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aurei* (B) unter nicht-entzündlichen Bedingungen (PBS) und  $\text{TNF-}\alpha$ -induzierter Entzündung ( $\text{TNF-}\alpha$ ). Weder unter nicht-entzündlichen Bedingungen noch  $\text{TNF-}\alpha$ -induzierter Entzündung zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen netznahen Venolen (schwarze Balken) und netzfernen Kontrollvenolen (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$ SEM. <sup>+</sup> $p < 0,05$  vs. korrespondierende PBS Gruppe.

### 6.2.3 Granulationsgewebe

Die Implantation eines chirurgischen Netzes führt im Rahmen der Inkorporation des Fremdmaterials zur Bildung von Granulationsgewebe, das die einzelnen Netzfaser umschließt. In der vorliegenden Arbeit konnte an histologischen Schnitten gezeigt werden, dass es 12 Tage nach Implantation des Ultrapro®-Netzes bereits zur Ausbildung eines gut vaskularisierten Granulationsgewebes um das Implantat gekommen war (*Abbildung 28*).



**Abbildung 28:** A, B: HE-gefärbte Schnitte des Kammergewebes 12 Tage nach Implantation des Ultrapro®-Netzes auf den quergestreiften Hautmuskel (A, Pfeile). Die Netzfaser des Ultrapro®-Netzes (\*) waren zu diesem Zeitpunkt bereits komplett von Granulationsgewebe umgeben. Die Vergrößerung (B) verdeutlicht, dass dieses Granulationsgewebe bereits von einem dichten Netzwerk an neugebildeten Mikrogefäßen durchzogen ist (Pfeilspitzen). Maßstäbe: A=165µm; B=50µm.

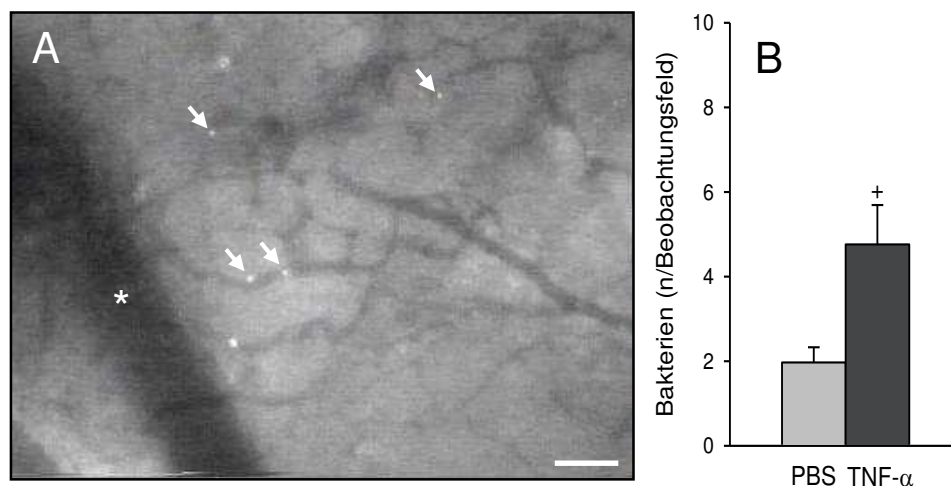


**Abbildung 29:** A: Intravitalmikroskopisches Bild neugebildeter Gefäße im Granulationsgewebe um ein implantiertes Netz (\*). Blaulicht-Epi-Illumination; Maßstab: 90µm. B: Die funktionelle Kapillardichte im Granulationsgewebe um das Netz 12 Tage nach Implantation zeigt keine Unterschiede zwischen der Versuchsgruppe ohne vorherige Injektion von *S. aureus* (-Bakt) und der Versuchsgruppe, die  $10^9$  FITC-gefärbte *S. aurei* (+Bakt) injiziert bekommen hatte. Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die Netzümplantate führten im Granulationsgewebe die Entwicklung neuer Blutgefäße herbei (Abbildung 29 A). Am 12. Tag nach Netzümplantation lag die funktionelle Kapillardichte dieser neugebildeten Gefäße bei  $\sim 195\text{-}220\text{cm/cm}^2$  ohne Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Abbildung 29 B).

### 6.2.3.1 Adhärente Bakterien in neugebildeten Gefäßen

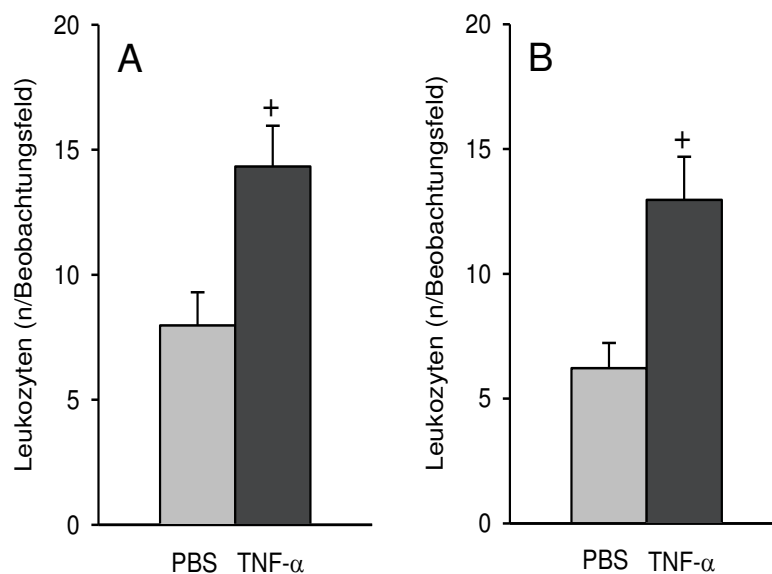
Die TNF- $\alpha$ -induzierte Entzündung in der Rückenhautkammer führte im Vergleich zu nicht-entzündlichen Bedingungen zu einem signifikanten Anstieg der adhärenenten Bakterien innerhalb der neugebildeten Gefäße des Granulationsgewebes um die Netzümplantate (Abbildung 30 B).



**Abbildung 30:** A: Intravitalmikroskopisches Bild adhärenenten Bakterien innerhalb der neugebildeten Gefäße des Granulationsgewebes um das Netzümplantat (\*) 5 Minuten nach Injektion von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aurei* (Pfeile) in einen Syrischen Goldhamster. Blaulich-Epi-Illumination; Maßstab:  $70\mu\text{m}$ . B: Unter entzündlichen Bedingungen (TNF- $\alpha$ ) zeigte sich im Vergleich zu nicht-entzündlichen Bedingungen (PBS) eine signifikante Steigerung der Anzahl adhärenenten Bakterien innerhalb der neugebildeten Gefäße des Granulationsgewebes. Mittelwert  $\pm$ SEM.  $^+p<0,05$  vs. PBS Gruppe.

### 6.2.3.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in neugebildeten Gefäßen

Die TNF- $\alpha$ -induzierte Entzündung in der Rückenhautkammer führte im Vergleich zu nicht-entzündlichen Bedingungen zu einem signifikanten Anstieg der adhärenenten Leukozyten innerhalb der neugebildeten Gefäße des Granulationsgewebes um die Netzümplantate. Dies war sowohl in Anwesenheit von Bakterien (Abbildung 31 B) als auch ohne Bakterien (Abbildung 31 A) der Fall. Dabei zeigte sich, dass die Anwesenheit der Bakterien die Adhärenz der Leukozyten nicht beeinflusste.



**Abbildung 31:** A, B: Adhärenz Leukozyten innerhalb der neugebildeten Gefäße des Granulationsgewebes ohne vorherige Injektion von *S. aureus* (A) und 5 Minuten nach Injektion von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aureus* (B) unter nicht-entzündlichen Bedingungen (PBS) und TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung (TNF- $\alpha$ ). Die TNF- $\alpha$ -induzierte Entzündung (TNF- $\alpha$ ) führte sowohl in Abwesenheit von *S. aureus* als auch nach Injektion von *S. aureus* im Vergleich zu nicht-entzündlichen Bedingungen (PBS) zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl adhärenter Leukozyten. Mittelwerte $\pm$ SEM; <sup>+</sup> $p < 0,05$  vs. PBS.

## 6.2.4 Mikrohämodynamik

Die untersuchten Venolen beider Versuchsgruppen wiesen einen Gefäßdurchmesser von  $\sim 35\mu\text{m}$  auf. Die Blutzellgeschwindigkeit in diesen Venolen lag bei  $\sim 250\text{--}280\mu\text{m/s}$  ohne signifikante Unterschiede zwischen Tieren, denen Bakterien appliziert worden waren, und Tieren ohne Bakterien. Daraus errechnete sich ein mikrovaskulärer Blutfluss von  $\sim 155\text{--}177\text{pl/s}$  und eine Scherrate von  $\sim 60\text{--}70\text{s}^{-1}$  (Tabelle 4).

	Ohne Bakterien		Mit Bakterien	
	Kon	Netz	Kon	Netz
Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	$34,7 \pm 1,2$	$35,0 \pm 1,6$	$33,5 \pm 2,0$	$34,5 \pm 1,8$
Blutzellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ )	$281,1 \pm 29,2$	$279,1 \pm 28,5$	$280,8 \pm 27,6$	$250,3 \pm 24,5$
Mikrovaskulärer Blutfluss (pl/s)	$177,0 \pm 30,8$	$176,3 \pm 27,4$	$160,0 \pm 25,4$	$154,9 \pm 27,2$
Scherrate ( $\text{s}^{-1}$ )	$63,9 \pm 5,0$	$64,0 \pm 6,2$	$68,2 \pm 7,2$	$57,9 \pm 4,7$

**Tabelle 4:** Durchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, mikrovaskulärer Blutfluss und Scherrate in postkapillären Venolen und Sammelvenolen in Netznähe (Netz) und netzfernen Bereichen (Kon) nach Applikation von  $10^9$  FITC-gefärbten *S. aureus* (mit Bakterien) und ohne Bakterien. Mittelwerte $\pm$ SEM.

## **7. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE**

### **7.1 Bedeutung von gC1qR/p33 für die Interaktion von S. aureus mit dem mikrovaskulären Endothel**

- I. Die Blockade von gC1qR reduzierte die Adhärenz von S. aureus an Endothelzellen in vitro und in vivo sowohl unter nicht-entzündlichen als auch unter entzündlichen Bedingungen signifikant.
- II. Die Blockade von gC1qR zeigte keinen Einfluss auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in postkapillären Venolen und Sammelvenolen, weder unter nicht-entzündlichen noch unter entzündlichen Bedingungen.
- III. Die Blockade von gC1qR reduzierte unter entzündlichen Bedingungen die Gefäßwandpermeabilität der untersuchten Venolen.
- IV. Die Blockade von gC1qR zeigte keinen Einfluss auf die Mikrohämodynamik (Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, mikrovaskulärer Blutfluss, Scherrate) in den untersuchten Venolen.

### **7.2 Implantation chirurgischer Netze bewirkt keine Interaktion von S. aureus mit dem mikrovaskulären Endothel**

- I. Das chirurgische Netzimplantat führte 12 Tage nach Implantation zur Ausbildung eines gut vaskularisierten Granulationsgewebes.
- II. Weder unter nicht-entzündlichen Bedingungen noch TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung zeigte sich ein Einfluss des chirurgischen Netzimplantates auf die Interaktion von S. aureus mit dem mikrovaskulären Endothel.
- III. Entzündliche Bedingungen bewirken eine Erhöhung der Anzahl adhärenter S. aurei und Leukozyten am Endothel der neugebildeten Gefäße des Granulationsgewebes. Gleichzeitig zeigte die Applikation von S. aureus keinen Einfluss auf die Leukozyten-Adhärenz in den neugebildeten Gefäßen.
- IV. Die Applikation von S. aureus führte zu einer signifikanten Reduktion der rollenden Leukozyten in postkapillären Venolen und Sammelvenolen, hatte aber keinen Einfluss auf die Leukozyten-Adhärenz an das mikrovaskuläre Endothel.
- V. Weder das chirurgische Netzimplantat noch die Applikation von S. aureus beeinflussten die Mikrohämodynamik (Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, mikrovaskulärer Blutfluss, Scherrate) in den untersuchten Mikrogefäßen.

## **8. DISKUSSION**

### **8.1 Diskussion des Modells**

#### **8.1.1 Rückenhautkammer**

In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster verwendet. Dieses Modell wurde seit seiner Erstbeschreibung durch Endrich et al. [1980] in zahlreichen Studien erfolgreich eingesetzt. Generell kann die Rückenhautkammer in unterschiedlichen Spezies präpariert werden. Zu diesen zählen Mäuse [Lehr et al., 1993], Hamster [Endrich et al., 1980] und Ratten [Papenfuss et al., 1979]. Die Maus bietet als Versuchstier den Vorteil, dass sie bereits gut genetisch charakterisiert ist und viele kommerziell erhältliche Knockout-Stämme sowie spezifische Antikörper existieren. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch der Hamster als Versuchstier eingesetzt, da er für die Präparation der Rückenhautkammer entscheidende anatomische Vorteile bietet. Der *Musculus retractor* ist hier nur wenig mit der darunter liegenden quergestreiften Hautmuskulatur (*M. panniculus carnosus*) verwachsen. Dies ermöglicht eine einfache chirurgische Präparation der einzelnen Gewebeschichten, wodurch das chirurgische Trauma während der Präparation der Rückenhautkammer auf ein Minimum begrenzt werden kann. Zudem ist beim Hamster die zur Beobachtung freipräparierte quergestreifte Hautmuskulatur dünner, wodurch eine bessere mikroskopische Bildqualität erzielt wird als bei der Maus oder der Ratte [Menger et al., 2002].

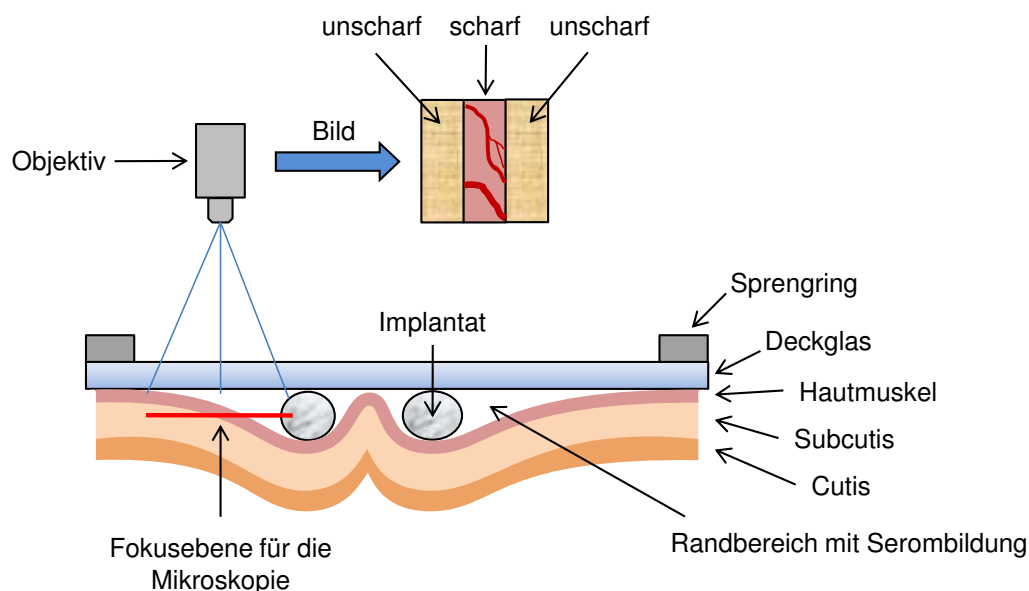
Neben der Rückenhautkammer existieren weitere Modelle zur mikroskopischen Analyse der Mikrozirkulation. Hierzu zählen Präparationen des Mesenteriums [Zanoni et al., 2009], der Backentasche am Hamster [Falabella et al., 2009] oder des freipräparierten Kremastermuskels von Mäusen [Rumbaut et al., 2006]. Gegenüber diesen Modellen bietet die Rückenhautkammer den Vorteil, dass die Analyse der Mikrozirkulation zeitversetzt zur chirurgischen Präparation erfolgt. Dadurch sind die akuten Gewebereaktionen auf das chirurgische Trauma der Präparation bereits abgeklungen, wodurch eine Analyse unter physiologischen Bedingungen möglich ist.

Gleichzeitig erlaubt die Kammerkonstruktion durch das entfernbare Deckglas die vergleichbar einfache Implantation von Biomaterialien oder Transplantation von Gewebe [Menger et al., 2002]. Das Modell der Rückenhautkammer wurde bereits erfolgreich für die Analyse der Biokompatibilität und Vaskularisierung von verschiedenen Biomaterialien für Prothesen eingesetzt [Menger et al., 1990, 1992]. Hierzu zählen unter anderem



Metallimplantate [Kraft et al., 2000, 2001], Knochenersatzmaterialien [Laschke et al., 2007] und Scaffolds, die beim Tissue Engineering eingesetzt werden [Rücker et al., 2006]. Des Weiteren eignet sich die Rückenhautkammer aber auch hervorragend zur Transplantation und Analyse der Vaskularisierung von Tumorgewebe. Unter anderem konnten hier in vergangenen Studien bereits Erkenntnisse über Tumorstadium und -angiogenese und mögliche therapeutische Optionen gewonnen werden [Strieth et al., 2004; Vajkoczy et al., 1998].

Limitationen des Rückenhautkammermodells bestehen vor allem in der begrenzten Größe der zu untersuchenden Implantate. Begrenzend ist hierbei die Dicke des Materials, da mit zunehmender Dicke eine verstärkte Serombildung die mikroskopische Bildqualität im Randbereich um das Implantat senkt. Gleichzeitig verkleinert sich mit zunehmender Dicke des Implantates der Anteil des mit dem Mikroskop fokussierbaren Rückenhautkammergewebes, da dieses nicht mehr in einer Ebene senkrecht zum Strahlengang liegt (*Abbildung 32*). In der praktischen Anwendung zeigt sich hierbei, dass die Untersuchung von Implantaten bis zu einem Durchmesser von 3mm und einer Materialdicke von 1mm problemlos möglich ist. Die im Rahmen der Versuche verwendeten Netzmaschen des Ultrapro® Netzes entsprachen mit einer Größe von ca. 3mm x 3mm x 1mm diesen Anforderungen.



**Abbildung 32:** Schematische Übersicht einer Rückenhautkammerpräparation mit Implantat. Durch das Biomaterial kommt es zum Abheben der Hautmuskelschicht vom Deckglas, was wiederum eine verstärkte Serombildung im Randbereich des Implantates zur Folge haben kann.

### 8.1.2 *S. aureus*

In der vorliegenden Studie wurden *S. aurei* verwendet, die bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase kultiviert wurden. Frühere Studien haben gezeigt, dass diese Bakterien eine höhere Adhärenz an das Endothel aufweisen als Bakterien, die der stationären Wachstumsphase entstammen [Kerdudou et al., 2006]. *S. aureus* ist darüber hinaus unter normalen Bedingungen in der Lage, eine ganze Reihe von Pathogenitätsfaktoren zu bilden [Dryden, 2009]. Für unsere Studie hingegen wurden die verwendeten *S. aurei* mittels Formalin inaktiviert. Dadurch konnten ungewollte Effekte der von *S. aureus* gebildeten Exotoxine auf die Endothelintegrität [Temmesfeld-Wollbruck et al., 2007] und den Aktivierungszustand von Endothelzellen [Grimminger et al., 1997] und der Leukozyten [Pruefer et al., 2002] ausgeschlossen werden. Außerdem wäre es bei aktiven FITC-gefärbten *S. aurei* durch die Teilung der Bakterien in Zusammenhang mit der kurzen Generationszeit von 30 min und durch aktive Ausschleusungsprozesse des Farbstoffes zu einer schnellen Abnahme der Fluoreszenz-Färbung der Bakterien gekommen. Dennoch lassen sich die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse durchaus auf das Bindungsverhalten von aktiven *S. aurei* übertragen, da frühere Studien bereits zeigten, dass die Inaktivierung der Mikroorganismen keinen Einfluss auf deren Bindungsverhalten am Gefäßendothel hat [Sinha et al., 1999; Sinha et al., 2000].

## 8.2 Diskussion der Untersuchungsmethoden

### 8.2.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Bei der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie werden unterschiedliche Fluorochrome appliziert, die durch Licht bestimmter Wellenlängen angeregt werden und anschließend Licht einer anderen Wellenlänge emittieren. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie arbeitet dabei meist nach dem Prinzip der Epi-Illumination. Dadurch ist es möglich, auch Organe, die aufgrund ihrer Ausdehnung und fehlenden Lichtdurchlässigkeit einer Betrachtung mit Hilfe der Durchlichttechnik nicht zugänglich sind, zu mikroskopieren. Mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie wurden beispielsweise bereits Studien zur Analyse der Mikrozirkulation der Leber [Keller et al., 2005; Roller et al., 2010], des Gehirns [Gavins et al., 2007], des Knochens [Hansen-Algenstaedt et al., 2005], der Lunge [Pizanis et al., 2009] und des Herzens [Schramm et al., 2007] durchgeführt.

Das Modell der Rückenhautkammer in Kombination mit der Technik der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie erlaubt Analysen der Mikrozirkulation aller Gefäßabschnitte der

quergestreiften Rückenhautmuskulatur und der darunterliegenden Subcutis [Laschke et al., 2005b]. Im Einzelnen sind dies die terminalen Arteriolen, nutritiven Kapillaren, postkapillären Venolen und Sammelvenolen. Zusätzlich läßt sich durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe die Integrität des Gefäßendothels [Rücker et al., 2008] sowie das Fließverhalten verschiedener korpuskulärer Bestandteile des Blutes wie Leukozyten und Thrombozyten analysieren [Laschke et al., 2009; Laschke et al., 2007; Struthmann et al., 2009]. Des Weiteren eignet sich die intravitale Fluoreszenzmikroskopie auch zur Untersuchung des Fließverhaltens von Fluoreszenz-markierten Mikroorganismen [Kerdudou et al., 2006].

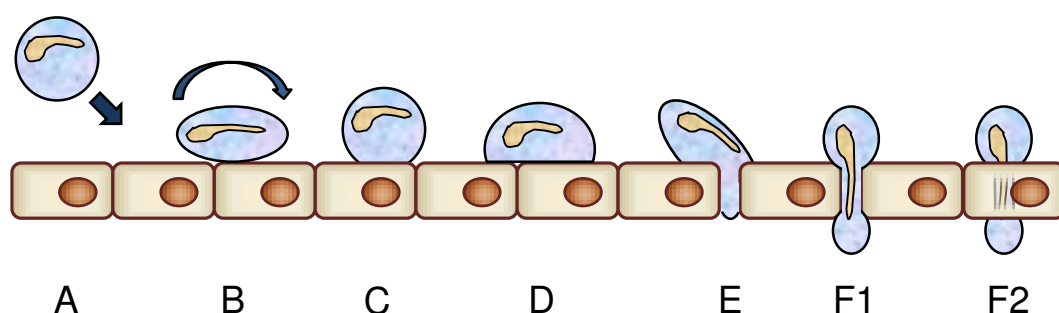
Bei der intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist zu beachten, dass es bei der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen und einer hohen Lichtintensität der Lichtquelle zu phototoxischen Reaktionen kommen kann. Verursacht werden diese entweder direkt durch eine thermische Schädigung des Gewebes oder durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die bei Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe entstehen [Steinbauer et al., 2000]. Phototoxische Reaktionen können sich in Form von arteriolären Vasospasmen oder einer Thrombusbildung mit konsekutivem Versagen der mikrovaskulären Perfusion äußern [Herrmann, 1983]. Weiterhin kann es zur vermehrten Adhärenz von Leukozyten an das Gefäßendothel kommen [Saetzler et al., 1997]. Das Auftreten phototoxischer Reaktionen korreliert dabei mit steigender systemischer Konzentration der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sowie der Lichtintensität und Einwirkdauer [Steinbauer et al., 2000]. Aus diesem Grund wurde die Dosierung der Fluoreszenzfarbstoffe in der vorliegenden Arbeit auf ein notwendiges Minimalmaß reduziert. Weiterhin wurde die Mikroskopiedauer möglichst gering gehalten und die mikroskopischen Aufnahmen erst im Anschluss ausgewertet. Hierdurch konnten Verfälschungen der Ergebnisse durch phototoxische Effekte weitgehend ausgeschlossen werden.

## **8.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **8.3.1 Bedeutung von gC1qR/p33 für die Interaktion von *S. aureus* mit dem mikrovaskulären Endothel**

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Blockade von gC1qR mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 74.5.2 die Adhärenz von *S. aureus* an das venuläre Endothel signifikant reduziert. Dies war sowohl unter nicht-entzündlichen Bedingungen als auch bei TNF- $\alpha$  induzierter Entzündung der Fall. TNF- $\alpha$  induziert verschiedene pro-

inflammatorische Kaskaden in Endothelzellen [Bradley, 2008] und in im Blut zirkulierenden Zellen, wie z.B. Leukozyten [Vaday et al., 2001]. Gleichzeitig erhöht TNF- $\alpha$  die Bindung von *S. aureus* an das venuläre Endothel [Laschke et al., 2005b]. Es wäre daher möglich, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der Bakterienadhärenz an das venuläre Endothel durch die Beeinflussung eines TNF- $\alpha$ -induzierten Liganden oder durch die Modulation der inflammatorischen Reaktion erfolgte. Da jedoch auch unter nicht-entzündlichen Bedingungen die Anzahl adhärenter Bakterien durch die Applikation des monoklonalen Antikörpers 74.5.2 signifikant reduziert wurde, ist es wahrscheinlicher, dass die gC1qR-Inhibition die Bindung von *S. aureus* direkt beeinflusste. Der zugrundeliegende Mechanismus könnte die Blockade von auf Endothelzellen exprimiertem gC1qR durch den Antikörper sein. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass von *S. aureus* gebildetes Protein A mit gC1qR interagiert [Nguyen et al., 2000]. Dementsprechend konnte auch in vitro eine Reduktion der Adhärenz von *S. aureus* an humanen Endothelzellen durch die Blockade von gC1qR gezeigt werden. Jedoch war hierbei der Effekt nicht so stark ausgeprägt wie in den durchgeführten in vivo Versuchen. Dies könnte darin begründet sein, dass der gegen gC1qR gerichtete Antikörper in vivo zusätzlich mit weiteren Blutbestandteilen interagiert. Thrombozyten und Fibrinogen besitzen die Möglichkeit, direkt an Endothelzellen zu binden [Andrews und Berndt, 2004]. Gleichzeitig wird die Adhäsion von *S. aureus* an das Endothel teilweise über die Bindung an Thrombozyten oder Fibrinogen vermittelt. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass der Antikörper 74.5.2 die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten und Fibrinogen beeinflusst [Nguyen et al., 2000], wodurch sich zusätzliche indirekte Wirkmechanismen des Antikörpers 74.5.2 auf die Bakterien-Endothelzell-Interaktion in vivo ergeben könnten.



**Abbildung 33:** Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Zirkulierende Leukozyten treten zunächst zufällig in Kontakt mit Endothelzellen (A). Vermittelt über Selektine beginnen die Leukozyten über das Endothel zu rollen (B). Bei weiterer Aktivierung der Leukozyten kommt es schließlich zur Integrin-vermittelten Adhärenz (C). Im Anschluss daran verbreitert der Leukozyt die Kontaktfläche mit dem Endothel (D) und transmigriert schließlich parazellulär oder transzellulär in das umliegende Gewebe (E-F). Abbildung modifiziert nach Ley et al. (2007).

Neben der Adhärenz von *S. aureus* an das venuläre Endothel wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion untersucht (*Abbildung 33*). Diese Interaktion wird von einer Reihe von spezifischen Bindungsmolekülen vermittelt. Kommt es zu einer Aktivierung der Leukozyten bzw. der Endothelzellen, beispielsweise im Rahmen einer Entzündungsreaktion, fangen die Leukozyten an, über das Gefäßendothel zu rollen. Hauptsächlich verantwortlich für dieses „Leukozyten-Rolling“ sind Bindungsmoleküle der Familie der Selektine [Langer und Chavakis, 2009]. Das Rollen am Endothel bildet die Voraussetzung für die anschließende feste Adhärenz der Leukozyten an das Endothel mit Hilfe der Integrine, die auf Leukozyten exprimiert werden. Von besonderer Bedeutung sind hier das „Lymphocyte Function-associated Antigen-1“ (LFA-1) und das Integrin CD11b/CD18 (MAC-1), die an Endothelzellen durch Moleküle der Immunglobulin Superfamilie, wie das „Intercellular Adhesion Molecule-1“ (ICAM-1) und das „Vascular Adhesion Molecule-1“ (VCAM-1), binden [Ley et al., 2007].

Durch die Wirkung von TNF- $\alpha$  werden bestimmte endotheliale Adhäsionsmoleküle für Leukozyten, wie beispielsweise E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 hochreguliert [Bradley, 2008]. Zusätzlich führt eine Exposition mit TNF- $\alpha$  zu einer Chemokin-Ausschüttung durch die Endothelzellen, die eine weitere Leukozytenrekrutierung zur Folge hat [Rollins et al., 1990]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten dementsprechend, dass die topische Applikation von TNF- $\alpha$  zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion innerhalb der Rückenhautkammer mit signifikantem Anstieg der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion führte. Interessanterweise hatte jedoch die Inhibition von gC1qR keinen Einfluss auf diese gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Dies liefert weitere Hinweise dafür, dass die Inhibition der Bakterien-Endothelzell-Interaktion nicht durch eine Modulation der Entzündungsreaktion verursacht wurde.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit die Gefäßwandpermeabilität der Venolen innerhalb der Rückenhautkammer analysiert, da die Applikation von TNF- $\alpha$  nicht nur die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion steigert, sondern auch die Integrität des Endothels maßgeblich beeinträchtigt. Die Bindung von TNF- $\alpha$  an seinen Liganden auf der Endothelzelle führt über einen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg zur Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) und des Ras-Homologes RhoA, das regulatorische Funktionen in der Formation des Zytoskeletts besitzt [Vandenbroucke et al., 2008]. Dies führt zum Auseinanderbrechen von endothelialen Zell-Zell-Verbindungen, wodurch die parazelluläre Permeabilität steigt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter entzündlichen Bedingungen in Anwesenheit des monoklonalen Antikörpers gegen gC1qR die Gefäßwandpermeabilität im

Vergleich zur Kontrolle reduziert war. Mögliche Mechanismen für diese Beobachtungen könnten in der Rolle von gC1qR innerhalb der Aktivierung der Kininkaskade begründet sein [Joseph et al., 1999]. Das im Rahmen der Kininkaskade freiwerdende Bradykinin erhöht die Gefäßwandpermeabilität der Venolen [Matsumoto et al., 1984; Svensjo und Arfors, 1979]. Entsprechend könnte hier die Blockade von gC1qR und die damit verbundene Hemmung der Bradykinin-Freisetzung zu einer Erhöhung der Gefäßwandintegrität beigetragen haben.

### 8.3.1.1 Klinische Perspektiven

Mit dem rapiden Anstieg von multiresistenten *S. aureus* Stämmen und der wachsenden Anzahl von durch *S. aureus* verursachten Infektionen wird die Notwendigkeit neuer Therapieoptionen immer größer. Bisher konzentrierten sich neue therapeutische Strategien vor allem auf die Entwicklung von Antibiotika mit neuartigen Wirkmechanismen [Barton und MacGowan, 2009]. Mit der genaueren Kenntnis der pathogenetisch bedeutsamen Schritte in der Entwicklung von endovaskulären *S. aureus*-Infektionen erschloss sich in den letzten Jahren ein großes Spektrum an neuartigen Therapieoptionen. Hierzu zählen unter anderem immuntherapeutische Ansätze. Besonders zu nennen ist hier die Entwicklung des monoklonalen Antikörpers Tefibazumab, der sich mittlerweile in einem weit fortgeschrittenen Stadium der Zulassung durch die „Food and Drug Administration (FDA)“ in den USA befindet [Patti, 2004]. Dieser Antikörper richtet sich gegen den zu den MSCRAMM zählenden CIF A und inhibiert auf diese Weise die Bindung des Bakteriums an das Endothel [Weems et al., 2006]. Präklinische Studien an Mäusen mit einer MRSA-Bakteriämie zeigten hier bereits protektive Effekte mit einer reduzierten Mortalität [Hall et al., 2003]. Darüber hinaus konnte durch die Gabe des Antikörpers in Modellen einer MRSA-Endokarditis eine Effizienzsteigerung einer antibiotischen Therapie erreicht werden [Domanski et al., 2005].

Aufgrund der großen Bandbreite unterschiedlicher Pathogenitätsfaktoren, die von *S. aureus* synthetisiert werden, ergibt sich ein großes Feld an Targets für neue Therapeutika. Längst sind nicht alle Adhäsionsmechanismen und die dazugehörigen Liganden ausreichend erforscht. Dabei sind einige Autoren der Meinung, dass die Blockade der Bindungsliganden im Wirt einen Ansatzpunkt mit großem Potential darstellt [Widmer et al., 2006]. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Blockade von gC1qR mittels monoklonalem Antikörper die Adhärenz von *S. aureus* an das venuläre Endothel signifikant inhibiert. Dies könnte zur Entwicklung neuer Therapiestrategien in der Behandlung endovaskulärer *S. aureus* Infektionen beitragen.

### **8.3.2 Implantation chirurgischer Netze bewirkt keine Interaktion von *S. aureus* mit dem mikrovaskulären Endothel**

Die späte Netzinfection ist eine seltene, aber schwere Komplikation in der chirurgischen Therapie von Hernien. Generell werden derzeit verschiedene Theorien zu den Entstehungsmechanismen der späten Netzinfection diskutiert. Einerseits geht man davon aus, dass Netzimplantate während des chirurgischen Eingriffs exogen mit Bakterien kontaminiert werden. Da *S. aureus* befähigt ist, Biofilme auf Fremdmaterialien zu bilden, könnten die Bakterien auf diese Weise der anschließenden Phagozytose durch das Immunsystem des Wirtes entgehen [Engelsman et al., 2007]. Eine zusätzliche Rolle, speziell bei multifilamentären Netzen, könnten die Nischen zwischen den einzelnen Netzfäsern spielen, in denen es Bakterien erleichtert wird, über eine längere Zeitperiode nach Implantation zu persistieren [Taylor und O'Dwyer, 1999]. Andererseits ist es möglich, dass die späte Netzinfection auch aufgrund einer endogenen Keimverschleppung entsteht, wie dies bereits für die hämatogene Infektion von Gelenkprothesen beschrieben wurde [Ainscow und Denham, 1984]. Dieser Entstehungsmechanismus könnte zusätzlich durch das sich entwickelnde Granulationsgewebe um implantierte Netze gefördert werden, da dieses Gewebe leichter von Bakterien invadiert werden kann [Delikoukos et al., 2007; Foschi et al., 1998].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ein Netzimplantat die Interaktion von *S. aureus* mit dem Endothel weder unter nicht-entzündlichen noch entzündlichen Bedingungen beeinflusst. Daher kann das Netzimplantat mit umgebendem Granulationsgewebe nicht als primärer Stimulus für eine vermehrte Adhäsion von *S. aureus* in der Mikrozirkulation angesehen werden.

Das in dieser Arbeit analysierte Ultrapro®-Netz stellt ein modernes, leichtgewichtiges Komposite-Netz dar, das breite Anwendung im klinischen Alltag findet. Derzeit existiert ein weit gefächertes Angebot an unterschiedlichen Netzmaterialien für die Herniorrhaphie. Entsprechend ihrer Architektur und Materialzusammensetzung können diese in unterschiedlicher Weise mit Bakterien interagieren [Harrell et al., 2006]. Daher war es in dieser Arbeit nicht auszuschließen, dass ein anderes Netzmaterial eine höhere Adhärenz von *S. aureus* an das mikrovaskuläre Endothel verursacht hätte. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da eine Studie von Delikoukos et al. (2007) zeigt, dass die Inzidenz der späten Netzinfection weder mit dem verwendeten Netzmaterial, noch mit der durchgeführten Fixationsmethode des Netzes korreliert.

Die initiale Reaktion des Empfängerorgans auf ein implantiertes chirurgisches Netz geht im Normalfall mit einer akuten Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Entzündungszellen einher [Di Vita et al., 2005; Rosch et al., 2003]. So wird ein chirurgisches Netz nach der Implantation im Rahmen der Fremdkörperabwehr sofort durch eine Proteinschicht bedeckt. Diese wiederum führt zur Aktivierung von verschiedenen Subtypen inflammatorischer Zellen. Hierzu zählen Mastzellen, Makrophagen, T-Lymphozyten oder Granulozyten [Rosch et al., 2003; Tang et al., 1998]. Diese Zellen produzieren und sezernieren wiederum verschiedene proangiogene Faktoren, die an der Bildung eines stark vaskularisierten Granulationsgewebes um das Netzimplantat beteiligt sind [Mohle et al., 1997; Shaw et al., 2003]. Dementsprechend wiesen die hier implantierten Netze nach 12 Tagen ein Granulationsgewebe mit einem dichten Netzwerk an neugebildeten Gefäßen auf.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Zahl rollender und adhärenter Leukozyten unter nicht-entzündlichen Bedingungen 12 Tage nach Netzimplantation in einem physiologischen Bereich lag. Gleichzeitig war kein Unterschied zwischen netznahen Gefäßen und Kontrollgefäßen zu beobachten. Dies zeigt, dass im Rahmen der chronischen Entzündungsreaktion das Netzimplantat das umgebende Granulationsgewebe nicht für eine erhöhte Rekrutierung von Leukozyten sensibilisiert. Dies war auch unter TNF- $\alpha$ -induzierter Entzündung nicht der Fall.

Interessanterweise führte die Anwesenheit von Bakterien zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl rollender Leukozyten in den postkapillären Venolen und Sammelvenolen der Rückenhautkammer. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen früherer Studien, in denen es in den ersten Stunden nach Induktion eines septischen Geschehens zur Reduktion der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion innerhalb der Gefäße des Muskelgewebes beim Hamster kam [Hoffmann et al., 2004]. Ursächlich könnte hier die durch die Sepsis verursachte systemische Immunantwort mit einer massiven Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren sein. Zu diesen zählen TNF- $\alpha$  und IL-6, die zur Akkumulation von Leukozyten in der Lunge und verschiedenen viszerale Organen führen [Copeland et al., 2005; Malmros et al., 1994]. Weiterhin inhibiert *S. aureus* das P-Selektin-vermittelte Leukozyten-Rolling durch die Sekretion von „Staphylococcal Superantigen-like-5“ (SSL-5) [Bestebroer et al., 2007]. Dieser Mechanismus ist in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht relevant, da die verwendeten Bakterien inaktiviert wurden, um so unkontrollierte Effekte auf das Endothel durch sezernierte Exotoxine zu vermeiden.



Neben der Analyse der Bakterien- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den Venolen der Rückenhautkammer wurde zusätzlich die Adhärenz von Bakterien und Leukozyten in den neugebildeten Gefäßen des Granulationsgewebes um die Netzimplantate untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Adhärenz von Bakterien und Leukozyten an das Endothel vergleichbar mit dem Bindungsverhalten in vorbestehenden Venolen unter entzündlichen Bedingungen anstieg. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Studien, die zeigen, dass die Endothelzellen von neugebildeten Gefäßen ein Muster von Adhäsionsmolekülen aufweisen, das dem von nicht-proliferierenden Gefäßen sehr ähnelt [Vallien et al., 2000]. Zu diesen Adhäsionsmolekülen zählen PECAM-1, ICAM-2, E-Selektin und P-Selektin, die vermittelt durch Zytokine hochreguliert werden können [Vallien et al., 2000]. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Adhärenz von Leukozyten innerhalb der neugebildeten Gefäße durch die Anwesenheit der verwendeten Bakterien nicht beeinflusst wurde. Aktive *S. aurei* sind in der Lage, die Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus zu beeinflussen, um günstige Bedingungen für eine Kolonisierung und Persistenz zu schaffen [Chavakis et al., 2002]. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass von den Bakterien sezerniertes Eap an ICAM-1 bindet und auf diese Weise die Adhärenz von Leukozyten an das Gefäßendothel und die anschließende Transmigration der Leukozyten in das Gewebe inhibiert [Haggart et al., 2004]. Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *S. aurei* inaktiviert waren, war hier kein Einfluss von sezerniertem Eap auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zu erwarten.

### 8.3.2.1 Klinische Perspektiven

Die Implantation chirurgischer Netze gilt heute als Goldstandard in der chirurgischen Hernientherapie. Es ist daher davon auszugehen, dass in Zukunft einer zunehmenden Zahl von Patienten ein chirurgisches Biomaterial implantiert wird. Die späte Infektion der Implantate stellt zwar eine seltene, aber dennoch schwere Komplikation dieser Methode dar. Nicht geklärt ist bisher, durch welche Mechanismen es zur späten Netzinfection kommt. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen, dass das implantierte Biomaterial selbst keinen erhöhten Stimulus für die Adhärenz zirkulierender Bakterien am Gefäßendothel darstellt. Entsprechend scheinen andere Entstehungsmechanismen für die Entwicklung einer späten Netzinfection verantwortlich zu sein. Beispielsweise könnte eine unbemerkte Kontamination des Biomaterials während der Implantation und die anschließende Persistenz der Mikroorganismen auf der Oberfläche des chirurgischen Netzes in der Pathogenese der späten Netzinfection eine weitaus größere Rolle spielen als bisher angenommen. Dies würde einerseits die Notwendigkeit eines streng aseptischen Vorgehens während der Implantation

unterstreichen, andererseits eröffnen sich dadurch auch mögliche prophylaktische Optionen, z.B. durch die Beschichtung des Biomaterials mit antibakteriellen Substanzen, wie es bereits bei Nahtmaterialien durchgeführt wird [Cohen et al., 2007; Justinger et al., 2009; Saygun et al., 2006]. Zusätzlich propagieren verschiedene Autoren die Verwendung von makroporösen Biomaterialien mit einer Porengröße von über 75µm, da die Bakterien in kleineren Nischen der Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten entgehen können [Amid, 1997; Taylor und O'Dwyer, 1999]. Nichtsdestotrotz fehlen derzeit randomisierte klinische Studien, um generelle Empfehlungen auszusprechen, wie das Biomaterial in Hinblick auf die Vermeidung einer späten Netzinfection konfektioniert sein sollte. Deshalb wird auch in nächster Zukunft die Entscheidung über das verwendete chirurgische Netzmaterial wesentlich auf Erfahrungswerten des Chirurgen sowie auf Kostenfaktoren basieren [Eriksen et al., 2007].

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Ainscow DA, Denham RA** (1984) The risk of haematogenous infection in total joint replacements. *J Bone Joint Surg Br* 66: 580-582.
2. **Amid PK** (1997) Classification of biomaterials and their related complications in abdominal wall hernia surgery. *Hernia* 1: 15-21.
3. **Andrews RK, Berndt MC** (2004) Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* 114: 447-453.
4. **Aufenacker TJ, van Geldere D, van Mesdag T, Bossers AN, Dekker B, Scheijde E, van Nieuwenhuizen R, Hiemstra E, Maduro JH, Juttman JW, Hofstede D, van Der Linden CT, Gouma DJ, Simons MP** (2004) The role of antibiotic prophylaxis in prevention of wound infection after Lichtenstein open mesh repair of primary inguinal hernia: a multicenter double-blind randomized controlled trial. *Ann Surg* 240: 955-960.
5. **Baker M, Wayland H** (1974) On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 7: 131-143.
6. **Barton E, MacGowan A** (2009) Future treatment options for Gram-positive infections-looking ahead. *Clin Microbiol Infect* 15: 17-25.
7. **Baruch D, Bahnak B, Girma JP, Meyer D** (1989) von Willebrand factor and platelet function. *Baillieres Clin Haematol* 2: 627-672.
8. **Bellon JM, Bujan J, Contreras L, Hernando A, Jurado F** (1994) Macrophage response to experimental implantation of polypropylene prostheses. *Eur Surg Res* 26: 46-53.
9. **Bellon JM, Garcia-Carranza A, Garcia-Honduvilla N, Carrera-San Martin A, Bujan J** (2004) Tissue integration and biomechanical behaviour of contaminated experimental polypropylene and expanded polytetrafluoroethylene implants. *Br J Surg* 91: 489-494.
10. **Bellon JM, Rodriguez M, Garcia-Honduvilla N, Gomez-Gil V, Pascual G, Bujan J** (2008) Postimplant behavior of lightweight polypropylene meshes in an experimental model of abdominal hernia. *J Invest Surg* 21: 280-287.
11. **Bestebroer J, Poppelier MJ, Ulfman LH, Lenting PJ, Denis CV, van Kessel KP, van Strijp JA, de Haas CJ** (2007) Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling. *Blood* 109: 2936-2943.
12. **Bradley JR** (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214: 149-160.
13. **Bryant JW, Shariat-Madar Z** (2009) Human plasma kallikrein-kinin system: physiological and biochemical parameters. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 7: 234-250.

14. **Buerkle MA, Lehrer S, Sohn HY, Conzen P, Pohl U, Krotz F** (2004) Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances platelet adhesion in hamster arterioles in vivo. *Circulation* 110: 2053-2059.
15. **Burger JW, Luijendijk RW, Hop WC, Halm JA, Verdaasdonk EG, Jeekel J** (2004) Long-term follow-up of a randomized controlled trial of suture versus mesh repair of incisional hernia. *Ann Surg* 240: 578-585.
16. **Burmeister H, Kaiser B, Siebenrock KA, Ganz R** (2004) Incisional hernia after periacetabular osteotomy. *Clin Orthop Relat Res* 177-179.
17. **Calcott MA, Muller-Eberhard HJ** (1972) C1q protein of human complement. *Biochemistry* 11: 3443-3450.
18. **Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI, Herrmann M, Preissner KT** (2002) Staphylococcus aureus extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* 8: 687-693.
19. **Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M** (2005) Staphylococcus aureus interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost* 94: 278-285.
20. **Chuang YY, Huang YC, Lin TY** (2005) Toxic shock syndrome in children: epidemiology, pathogenesis, and management. *Paediatr Drugs* 7: 11-25.
21. **Cobb WS, Harris JB, Lokey JS, McGill ES, Klove KL** (2003) Incisional herniorrhaphy with intraperitoneal composite mesh: a report of 95 cases. *Am Surg* 69: 784-787.
22. **Cobb WS, Peindl RM, Zerey M, Carbonell AM, Heniford BT** (2009) Mesh terminology 101. *Hernia* 13: 1-6.
23. **Cohen MS, Stern JM, Vanni AJ, Kelley RS, Baumgart E, Field D, Libertino JA, Summerhayes IC** (2007) In vitro analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh. *Surg Infect (Larchmt)* 8: 397-403.
24. **Collaboration EH** (2000) Mesh compared with non-mesh methods of open groin hernia repair: systematic review of randomized controlled trials. *Br J Surg* 87: 854-859.
25. **Copeland S, Warren HS, Lowry SF, Calvano SE, Remick D** (2005) Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 60-67.
26. **Corey GR** (2009) Staphylococcus aureus bloodstream infections: definitions and treatment. *Clin Infect Dis* 48 Suppl 4: 254-259.
27. **Delikoukos S, Tzovaras G, Liakou P, Mantzos F, Hatzitheofilou C** (2007) Late-onset deep mesh infection after inguinal hernia repair. *Hernia* 11: 15-17.

28. **Di Vita G, D'Agostino P, Patti R, Arcara M, Caruso G, Davi V, Cillari E** (2005) Acute inflammatory response after inguinal and incisional hernia repair with implantation of polypropylene mesh of different size. *Langenbecks Arch Surg* 390: 306-311.
29. **Domanski PJ, Patel PR, Bayer AS, Zhang L, Hall AE, Syribeys PJ, Gorovits EL, Bryant D, Vernachio JH, Hutchins JT, Patti JM** (2005) Characterization of a humanized monoclonal antibody recognizing clumping factor A expressed by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 73: 5229-5232.
30. **Dryden MS** (2009) Skin and soft tissue infection: microbiology and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 34: 2-7.
31. **Endrich B, Asaishi K, Gotz A, Messmer K** (1980) Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 177: 125-134.
32. **Engelsman AF, van der Mei HC, Ploeg RJ, Busscher HJ** (2007) The phenomenon of infection with abdominal wall reconstruction. *Biomaterials* 28: 2314-2327.
33. **Eriksen JR, Gogenur I, Rosenberg J** (2007) Choice of mesh for laparoscopic ventral hernia repair. *Hernia* 11: 481-492.
34. **Falabella CA, Jiang H, Frame MD, Chen W** (2009) In vivo validation of biological responses of bFGF released from microspheres formulated by blending poly-lactide-co-glycolide and poly(ethylene glycol)-grafted-chitosan in hamster cheek pouch microcirculatory models. *J Biomater Sci Polym Ed* 20: 903-922.
35. **Foschi D, Corsi F, Cellerino P, Trabucchi A, Trabucchi E** (1998) Late rejection of the mesh after laparoscopic hernia repair. *Surg Endosc* 12: 455-457.
36. **Foster TJ, Hook M** (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 6: 484-488.
37. **Funk W, Endrich B, Messmer K** (1986) A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. *Res Exp Med (Berl)* 186: 259-270.
38. **Gavins FN, Dalli J, Flower RJ, Granger DN, Perretti M** (2007) Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. *Faseb J* 21: 1751-1758.
39. **Ghebrehiwet B, Lim BL, Peerschke EI, Willis AC, Reid KB** (1994) Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q. *J Exp Med* 179: 1809-1821.
40. **Ghebrehiwet B, CebadaMora C, Tantral L, Jesty J, Peerschke EI** (2006) gC1qR/p33 serves as a molecular bridge between the complement and contact activation systems and is an important catalyst in inflammation. *Adv Exp Med Biol* 586: 95-105.

41. **Gomez MI, O'Seaghdha M, Magargee M, Foster TJ, Prince AS** (2006) Staphylococcus aureus protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *J Biol Chem* 281: 20190-20196.
42. **Gordon RJ, Lowy FD** (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. *Clin Infect Dis* 46: 350-359.
43. **Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Potzsch B, Priestersbach R, Bhakdi S, Suttorp N, Seeger W** (1997) Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins Escherichia coli hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J Immunol* 159: 1909-1916.
44. **Guo WX, Ghebrehwet B, Weksler B, Schweitzer K, Peerschke EI** (1999) Up-regulation of endothelial cell binding proteins/receptors for complement component C1q by inflammatory cytokines. *J Lab Clin Med* 133: 541-550.
45. **Haggar A, Ehrnfelt C, Holgersson J, Flock JI** (2004) The Extracellular Adherence Protein from Staphylococcus aureus Inhibits Neutrophil Binding to Endothelial Cells. *Infect Immun* 72: 6164-6167.
46. **Hall AE, Domanski PJ, Patel PR, Vernachio JH, Syribey PJ, Gorovits EL, Johnson MA, Ross JM, Hutchins JT, Patti JM** (2003) Characterization of a protective monoclonal antibody recognizing Staphylococcus aureus MSCRAMM protein clumping factor A. *Infect Immun* 71: 6864-6870.
47. **Hansen-Algenstaedt N, Schaefer C, Wolfram L, Joscheck C, Schroeder M, Algenstaedt P, Ruther W** (2005) Femur window-a new approach to microcirculation of living bone in situ. *J Orthop Res* 23: 1073-1082.
48. **Harrell AG, Novitsky YW, Kercher KW, Foster M, Burns JM, Kuwada TS, Heniford BT** (2006) In vitro infectability of prosthetic mesh by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Hernia* 10: 120-124.
49. **Hartleib J, Kohler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM, Foster TJ, Peters G, Kehrel BE, Herrmann M** (2000) Protein A is the von Willebrand factor binding protein on Staphylococcus aureus. *Blood* 96: 2149-2156.
50. **Hendry PO, Paterson-Brown S, de Beaux A** (2008) Work related aspects of inguinal hernia: a literature review. *Surgeon* 6: 361-365.
51. **Herrmann KS** (1983) Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc Res* 26: 238-249.
52. **Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Inthorn D, Fertmann J, Schildberg FW, Menger MD** (2004) Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med* 32: 1011-1017.

53. **Iwatsuki K, Yamasaki O, Morizane S, Oono T** (2006) Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. *J Dermatol Sci* 42: 203-214.
54. **Jezupovs A, Mihelsons M** (2006) The analysis of infection after polypropylene mesh repair of abdominal wall hernia. *World J Surg* 30: 2270-2280.
55. **Joseph K, Ghebrehiwet B, Kaplan AP** (1999) Cytokeratin 1 and gC1qR mediate high molecular weight kininogen binding to endothelial cells. *Clin Immunol* 92: 246-255.
56. **Justinger C, Moussavian MR, Schlueter C, Kopp B, Kollmar O, Schilling MK** (2009) Antibacterial [corrected] coating of abdominal closure sutures and wound infection. *Surgery* 145: 330-334.
57. **Kehlet H, Bay-Nielsen M** (2008) Nationwide quality improvement of groin hernia repair from the Danish Hernia Database of 87,840 patients from 1998 to 2005. *Hernia* 12: 1-7.
58. **Keller SA, Paxian M, Ashburn JH, Clemens MG, Huynh T** (2005) Kupffer cell ablation improves hepatic microcirculation after trauma and sepsis. *J Trauma* 58: 740-751.
59. **Kerdudou S, Laschke MW, Sinha B, Preissner KT, Menger MD, Herrmann M** (2006) Fibronectin binding proteins contribute to the adherence of *Staphylococcus aureus* to intact endothelium in vivo. *Thromb Haemost* 96: 183-189.
60. **Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H** (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10: 505-520.
61. **Klyscz T, Junger M, Jung F, Zeintl H** (1997) [Cap image-a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]. *Biomed Tech (Berl)* 42: 168-175.
62. **Kraft CN, Hansis M, Arens S, Menger MD, Vollmar B** (2000) Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *J Biomed Mater Res* 49: 192-199.
63. **Kraft CN, Burian B, Perlick L, Wimmer MA, Wallny T, Schmitt O, Diedrich O** (2001) Impact of a nickel-reduced stainless steel implant on striated muscle microcirculation: a comparative in vivo study. *J Biomed Mater Res* 57: 404-412.
64. **Kurzer M, Belsham PA, Kark AE** (2003) The Lichtenstein repair for groin hernias. *Surg Clin North Am* 83: 1099-1117.
65. **Langer HF, Chavakis T** (2009) Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med* 13: 1211-1220.
66. **Laschke MW, Häufel JM, Thorlacius H, Menger MD** (2005a) New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials in vivo. *J Biomed Mater Res A* 74: 696-704.

67. **Laschke MW, Kerdudou S, Herrmann M, Menger MD** (2005b) Intravital fluorescence microscopy: a novel tool for the study of the interaction of *Staphylococcus aureus* with the microvascular endothelium in vivo. *J Infect Dis* 191: 435-443.
68. **Laschke MW, Witt K, Pohlemann T, Menger MD** (2007) Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 82: 494-505.
69. **Laschke MW, Dold S, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H** (2009) The Rho-kinase inhibitor Y-27632 inhibits cholestasis-induced platelet interactions in the hepatic microcirculation. *Microvasc Res* 78: 95-99.
70. **Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K** (1993) Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143: 1055-1062.
71. **Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S** (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678-689.
72. **Malmros C, Holst E, Hansson L, Martensson L, Thorne J** (1994) Dynamic accumulation of neutrophils in lungs and visceral organs during early abdominal sepsis in the pig. *World J Surg* 18: 811-817.
73. **Mann DV, Prout J, Havranek E, Gould S, Darzi A** (1998) Late-onset deep prosthetic infection following mesh repair of inguinal hernia. *Am J Surg* 176: 12-14.
74. **Matsumoto K, Yamamoto T, Kamata R, Maeda H** (1984) Pathogenesis of serratal infection: activation of the Hageman factor-prekallikrein cascade by serratal protease. *J Biochem* 96: 739-749.
75. **McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ** (1994) Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 11: 237-248.
76. **Menger MD, Walter P, Hammersen F, Messmer K** (1990) Quantitative analysis of neovascularization of different PTFE-implants. *Eur J Cardiothorac Surg* 4:191-6.
77. **Menger MD, Hammersen F, Messmer K** (1992) In vivo assessment of neovascularization and incorporation of prosthetic vascular biografts. *Thorac Cardiovasc Surg* 40: 19-25.
78. **Menger MD, Laschke MW, Vollmar B** (2002) Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 34: 83-91.
79. **Milic DJ, Pejic MA** (2003) Tension-free procedures in the surgical treatment of groin hernias. *Srp Arh Celok Lek* 131: 82-91.
80. **Mohle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S** (1997) Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 663-668.



81. **Moks T, Abrahmsen L, Nilsson B, Hellman U, Sjoquist J, Uhlen M** (1986) Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem* 156: 637-643.
82. **Murray RJ** (2005) Staphylococcus aureus infective endocarditis: diagnosis and management guidelines. *Intern Med J* 35: 25-44.
83. **Naber CK** (2008) Future strategies for treating Staphylococcus aureus bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect* 14: 26-34.
84. **Neumayer L, Giobbie-Hurder A, Jonasson O, Fitzgibbons R, Jr., Dunlop D, Gibbs J, Reda D, Henderson W** (2004) Open mesh versus laparoscopic mesh repair of inguinal hernia. *N Engl J Med* 350: 1819-1827.
85. **Nguyen T, Ghebrehwet B, Peerschke EI** (2000) Staphylococcus aureus protein A recognizes platelet gC1qR/p33: a novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets. *Infect Immun* 68: 2061-2068.
86. **Ni Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Hook M, Foster TJ** (1998) Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* 30: 245-257.
87. **Nienhuijs S, Staal E, Strobbe L, Rosman C, Groenewoud H, Bleichrodt R** (2007) Chronic pain after mesh repair of inguinal hernia: a systematic review. *Am J Surg* 194: 394-400.
88. **Nishifuji K, Sugai M, Amagai M** (2008) Staphylococcal exfoliative toxins: "molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *J Dermatol Sci* 49: 21-31.
89. **Nyhus LM** (1993) Individualization of hernia repair: a new era. *Surgery* 114: 1-2.
90. **O'Dwyer PJ, Kingsnorth AN, Molloy RG, Small PK, Lammers B, Horeysek G** (2005) Randomized clinical trial assessing impact of a lightweight or heavyweight mesh on chronic pain after inguinal hernia repair. *Br J Surg* 92: 166-170.
91. **Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA** (1979) A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18: 311-318.
92. **Patti JM** (2004) A humanized monoclonal antibody targeting Staphylococcus aureus. *Vaccine* 22: 39-43.
93. **Peerschke EI, Bayer AS, Ghebrehwet B, Xiong YQ** (2006) gC1qR/p33 blockade reduces Staphylococcus aureus colonization of target tissues in an animal model of infective endocarditis. *Infect Immun* 74: 4418-4423.
94. **Pizanis N, Heckmann J, Wendt D, Tsagakis K, Jakob H, Kamler M** (2009) Improvement of pulmonary microcirculation after lung transplantation using phosphodiesterase-5 inhibitor modified preservation solution. *Eur J Cardiothorac Surg* 35: 801-806.

95. **Pries AR** (1988) A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp* 7: 327-345.
96. **Pruefer D, Makowski J, Schnell M, Buerke U, Dahm M, Oelert H, Sibelius U, Grandel U, Grimminger F, Seeger W, Meyer J, Darius H, Buerke M** (2002) Simvastatin inhibits inflammatory properties of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Circulation* 106: 2104-2110.
97. **Rios A, Rodriguez JM, Munitiz V, Alcaraz P, Perez Flores D, Parrilla P** (2001) Antibiotic prophylaxis in incisional hernia repair using a prosthesis. *Hernia* 5: 148-152.
98. **Rivera J, Vannakambadi G, Hook M, Speziale P** (2007) Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. *Thromb Haemost* 98: 503-511
99. **Roller J, Laschke MW, Scheuer C, Menger MD** (2010) Heme oxygenase (HO)-1 protects from lipopolysaccharide (LPS)-mediated liver injury by inhibition of hepatic leukocyte accumulation and improvement of microvascular perfusion. *Langenbecks Arch Surg*. 395: 387-394.
100. **Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS** (1990) Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* 136: 1229-1233.
101. **Rosch R, Junge K, Schachtrupp A, Klinge U, Klosterhalfen B, Schumpelick V** (2003) Mesh implants in hernia repair. Inflammatory cell response in a rat model. *Eur Surg Res* 35: 161-166.
102. **Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Schramm A, Mulhaupt R, Gellrich NC, Menger MD** (2006) Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials* 27: 5027-5038.
103. **Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Tavassol F, Mulhaupt R, Gellrich NC, Menger MD** (2008) Vascularization and biocompatibility of scaffolds consisting of different calcium phosphate compounds. *J Biomed Mater Res A* 86: 1002-1011.
104. **Rumbaut RE, Bellera RV, Randhawa JK, Shrimpton CN, Dasgupta SK, Dong JF, Burns AR** (2006) Endotoxin enhances microvascular thrombosis in mouse cremaster venules via a TLR4-dependent, neutrophil-independent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: 1671-1679.
105. **Rutkow IM** (2003) Demographic and socioeconomic aspects of hernia repair in the United States in 2003. *Surg Clin North Am* 83: 1045-1051.
106. **Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF** (1997) Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45: 505-513.

107. **Saygun O, Agalar C, Aydinuraz K, Agalar F, Daphan C, Saygun M, Ceken S, Akkus A, Denkbass EB** (2006) Gold and gold-palladium coated polypropylene grafts in a *S. epidermidis* wound infection model. *J Surg Res* 131: 73-79.
108. **Schramm R, Menger MD, Kirsch S, Langer F, Harder Y, Hamacher J, Schafers HJ** (2007) The subepicardial microcirculation in heterotopically transplanted mouse hearts: an intravital multicolor fluorescence microscopy study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 134: 210-217.
109. **Shaw JP, Chuang N, Yee H, Shamamian P** (2003) Polymorphonuclear neutrophils promote rFGF-2-induced angiogenesis in vivo. *J Surg Res* 109: 37-42.
110. **Sia IG, Berbari EF** (2006) Infection and musculoskeletal conditions: Osteomyelitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20: 1065-1081.
111. **Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P, Lew D, Krause KH, Peters G, Herrmann M** (2000) Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun* 68: 6871-6878.
112. **Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH** (1999) Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasins via fibronectin bridging to integrin  $\alpha 5 \beta 1$ . *Cell Microbiol* 1: 101-117.
113. **Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K** (2000) Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 385: 290-298.
114. **Steinberg JP, Clark CC, Hackman BO** (1996) Nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clin Infect Dis* 23: 255-259.
115. **Strieth S, Eichhorn ME, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Dellian M** (2004) Neovascular targeting chemotherapy: encapsulation of paclitaxel in cationic liposomes impairs functional tumor microvasculature. *Int J Cancer* 110: 117-124.
116. **Struthmann L, Hellwig N, Pircher J, Sohn HY, Buerkle MA, Klauss V, Mannell H, Pohl U, Krotz F** (2009) Prothrombotic effects of diclofenac on arteriolar platelet activation and thrombosis in vivo. *J Thromb Haemost* 7: 1727-1735.
117. **Sugerman HJ, Kellum JMJ, Reines HD, DeMaria EJ, Newsome HH, Lowry JW** (1996) Greater risk of incisional hernia with morbidly obese than steroid-dependent patients and low recurrence with prefascial polypropylene mesh. *Am J Surg* 171: 80-84.
118. **Svensjo E, Arfors KE** (1979) Dimensions of postcapillary venules sensitive to bradykinin and histamine-induced leakage of macromolecules. *Ups J Med Sci* 84: 47-60.
119. **Tang L, Jennings TA, Eaton JW** (1998) Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8841-8846.

120. **Taylor SG, O'Dwyer PJ** (1999) Chronic groin sepsis following tension-free inguinal hernioplasty. *Br J Surg* 86: 562-565.
121. **Temmesfeld-Wollbruck B, Brell B, David I, Dorenberg M, Adolphs J, Schmeck B, Suttorp N, Hippenstiel S** (2007) Adrenomedullin reduces vascular hyperpermeability and improves survival in rat septic shock. *Intensive Care Med* 33: 703-710.
122. **Vaday GG, Franitza S, Schor H, Hecht I, Brill A, Cahalon L, HersHKoviz R, Lider O** (2001) Combinatorial signals by inflammatory cytokines and chemokines mediate leukocyte interactions with extracellular matrix. *J Leukoc Biol* 69: 885-892.
123. **Vajkoczy P, Schilling L, Ullrich A, Schmiedek P, Menger MD** (1998) Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifuorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 510-520.
124. **Vallien G, Langley R, Jennings S, Specian R, Granger DN** (2000) Expression of endothelial cell adhesion molecules in neovascularized tissue. *Microcirculation* 7: 249-258.
125. **Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB** (2008) Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci* 1123: 134-145.
126. **von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G** (2001) Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 344: 11-16.
127. **Wann ER, Gurusiddappa S, Hook M** (2000) The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Biol Chem* 275: 13863-13871.
128. **Weems JJ, Jr., Steinberg JP, Filler S, Baddley JW, Corey GR, Sampathkumar P, Winston L, John JF, Kubin CJ, Talwani R, Moore T, Patti JM, Hetherington S, Texter M, Wenzel E, Kelley VA, Fowler VG, Jr.** (2006) Phase II, randomized, double-blind, multicenter study comparing the safety and pharmacokinetics of tefibazumab to placebo for treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2751-2755.
129. **Widmer E, Que YA, Entenza JM, Moreillon P** (2006) New concepts in the pathophysiology of infective endocarditis. *Curr Infect Dis Rep* 8: 271-279.
130. **Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB** (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39: 309-317.
131. **Yerdel MA, Akin EB, Dolalan S, Turkcapar AG, Pehlivan M, Gecim IE, Kuterdem E** (2001) Effect of single-dose prophylactic ampicillin and sulbactam on wound infection after tension-free inguinal hernia repair with polypropylene mesh: the randomized, double-blind, prospective trial. *Ann Surg* 233: 26-33.

132. **Zanoni FL, Benabou S, Greco KV, Moreno AC, Cruz JW, Filgueira FP, Martinez MB, de Figueiredo LF, Rocha e Silva M, Sannomiya P** (2009) Mesenteric microcirculatory dysfunctions and translocation of indigenous bacteria in a rat model of strangulated small bowel obstruction. *Clinics (Sao Paulo)* 64: 911-9.

## 10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und ohne deren Unterstützung das Erstellen der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M.D. Menger, Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, für die Überlassung des Themas sowie die herausragenden Möglichkeiten dieses zu bearbeiten.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M.W. Laschke möchte ich dafür danken, dass er mich mit unermüdlicher Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche sowie der Analyse und Interpretation der Ergebnisse unterstützt hat. Durch die anregenden Diskussionen mit ihm wurde mein wissenschaftliches Interesse weiter gefördert.

Bei Herrn Prof. Dr. med. M. Herrmann, Dr. med. S. Sethi und S. Kerdudou möchte ich mich für die fruchtbare Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Bakterien bedanken.

Weiterhin danke ich Frau Dr. rer. nat. C. Scheuer und Frau J. Becker für die großartige Unterstützung bei der Durchführung der in vitro Versuche und der histologischen Untersuchungen.

Meinen Kollegen am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie bin ich für das nette Arbeitsklima dankbar.

Außerdem möchte ich meinen Eltern für Ihre Liebe und Ihre fortwährende Unterstützung danken.

## 11. LEBENS LAUF

### Personalia

---

Name	Jonas Roller
Adresse	Blieskasteler Str. 31; 66424 Homburg
geboren	09.06.1982 in Filderstadt
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

### Beruf

---

seit 07/2009	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. M.D. Menger)
--------------	---

### Auszeichnungen

---

European Society for Surgical Research; Fellowship Award 2010: *“Role of Platelets and CD40L in Septic Lung Injury”*

### Auslandsaufenthalte

---

04/2010-06/2010	Forschungsaufenthalte im Rahmen eines Ph.D. Programmes im
09/2010-10/2010	<i>Department of Clinical Sciences, Surgery; Lund University, Malmö, Schweden</i>

### Studium

---

05/2009	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung,
03/2005	ärztliche Vorprüfung
seit 10/2002	Studium der Humanmedizin Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar

**Praktisches Jahr**

---

10/2008-01/2009	Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Universitätsklinik des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. Danilo Fliser)
06/2008-10/2008	Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, Universitätsklinik des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Schilling) Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinik des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. T. Pohlemann)
02/2008-06/2008	Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinik des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. R. Larsen)

**Famulaturen**

---

08/2007	Praxis Für Allgemeinmedizin, Stuttgart (Dr. Steyskal-Lang)
02/2007	Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinik des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. T. Pohlemann)
09/2006	Klinik für Neurologie, Universitätsklinik des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. K. Faßbender)
09/2005	Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. A. Königsrainer)



## 12. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

### 12.1 Originalarbeiten und Reviews

Sethi S, Herrmann M, **Roller J**, von Müller L, Peerschke EI, Ghebrehiwet B, Bajric I, Menger MD, Laschke MW (2010) Blockade of gC1qR/p33, a receptor for C1q, inhibits adherence of *Staphylococcus aureus* to the microvascular endothelium. *Microvascular research*, submitted.

**Roller J**, Laschke MW, Tschernig T, Schramm R, Veith N, Thorlacius H, Menger MD (2010) How to detect a dwarf – imaging of nanoparticles in the lung. Review. *Nanomedicine*, submitted.

Awla D, Abdulla A, Zhang S, **Roller J**, Regner S, Thorlacius H (2010) Lymphocyte function antigen-1 regulates neutrophil recruitment and tissue damage but not trypsinogen activation in acute pancreatitis. *British Journal of Pharmacology*, submitted.

**Roller J**, Laschke MW, Scheuer C, Menger MD (2010) Heme oxygenase (HO)-1 protects from lipopolysaccharide (LPS)-mediated liver injury by inhibition of hepatic leukocyte accumulation and improvement of microvascular perfusion. *Langenbecks Arch Surg* 395: 387-394.

Laschke MW, Häufel JM, **Roller J**, Schorr H, Menger MD (2009) Rapamycin, but not cyclosporine A, inhibits vascularization and incorporation of implanted surgical meshes. *Transplant International* 22: 654-662.

**Roller J**, Laschke MW, Sethi S, Herrmann M, Menger MD (2008) Prolene-Monocryl-composite meshes do not increase microvascular *Staphylococcus aureus* adherence and do not sensitize for leukocytic inflammation. *Langenbecks Arch Surg* 393: 349-357.

### 12.2 Zitierfähige Abstracts und Kongressbeiträge

**Roller J**, Schramm R, Laschke MW, Tschernig T, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H (2010) In vivo analysis of leukocyte endothelium interactions in the pulmonary microcirculation during polymicrobial sepsis. *Langenbecks Arch Surg* 395: 816.

Heinen CV, Amon M, Laschke MW, **Roller J**, Menger MD (2010) Aprotinin improves microvascular perfusion and protects against leukocytic inflammation after soft-tissue trauma. *Langenbecks Arch Surg* 395: 816-817.

**Roller J**, Laschke MW, Scheuer C, Menger MD (2010) Hämoxygenase (HO)-1 schützt vor septischem Leberschaden durch Inhibition der intrahepatischen Leukozytenakkumulation und Verbesserung der mikrovaskulären Perfusion. *Chirur Forum* 39: 215-216

**Roller J**, Laschke MW, Scheuer C, Menger MD. Hämoxygenase (HO)-1 schützt vor septischem Leberschaden durch Inhibition der intrahepatischen Leukozytenakkumulation und Verbesserung der mikrovaskulären Perfusion. 18. Wissenschaftliche Jahrestagung der saarländischen Chirurgenvereinigung e.V., Völklingen; Januar 2010.

**Roller J**, Lerner-Gräber A, Gerhart M, Speer T, Fliser D, Klingele M. Vielfalt der modernen Antikoagulation an Hämodialyse. 53. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft, Neustadt a.d. Weinstraße; Poster; März 2009.

Speer T, **Roller J**, Gerhart M, Lerner-Gräber A, Fliser D, Klingele M. Nur eingeschränkte Wirkung von Mircera® im höheren Dosisbereich bei einmaliger Gabe/Monat an Hämodialyse? 53. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft, Neustadt a.d. Weinstraße; Poster; März 2009.

Sethi S, Laschke MW, **Roller J**, von Müller L, Peerschke E, Ghebrehiwet B, Bajric I, Menger MD, Herrmann M (2008) Immunological inhibition of gC1qR/p33, a receptor for C1q, decreases adherence of *Staphylococcus aureus* to microvascular endothelium. *International Journal of Medical Microbiology* 298: 45.

**Roller J**, Laschke MW, Häufel JM, Menger MD (2008) Rapamycin, but not Cyclosporin A, inhibits vascularization and incorporation of implanted surgical meshes. *Langenbecks Arch Surg* 393: 759-760.

Sethi S, Laschke MW, **Roller J**, von Müller L, Peerschke E, Ghebrehiwet B, Bajric I, Menger MD, Herrmann M (2008) Immunological inhibition of gC1qR/p33, a receptor for C1q, decreases adherence of *Staphylococcus aureus* to microvascular endothelium. *Wiener Klinische Wochenschrift* 120: 40.

**Roller J**, Laschke MW, Sethi S, Herrmann M, Menger MD (2008) Prolene-Monocryl-Komposite-Netze induzieren weder eine Interaktion von Staphylokokkus aureus mit dem Gefäßendothel, noch begünstigen sie eine leukozytäre Entzündungsreaktion. Chirur Forum 37: 251-253.

**Roller J**, Laschke MW, Sethi S, Herrmann M, Menger MD (2007) Das Ultrapro-Netz steigert weder die Interaktion von Staphylokokkus aureus mit dem Gefäßendothel, noch begünstigt es eine leukozytäre Entzündungsreaktion. Langenbecks Arch Surg 392: 783.